



Neue Ansätze zur Hemmung der HIV-Replikation

Stephanie Rebensburg

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München, 13.05.2015

Neue Ansätze zur Hemmung der HIV-Replikation

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)

Durchgeführt am Institut für Virologie des Helmholtz Zentrums München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Vorgelegt von B.Sc. ^(8 Sem) Stephanie Rebensburg
aus Kreuth am Tegernsee

Erstgutachterin: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HIV als globales Gesundheitsproblem	1
1.2	Das HI-Virus.....	3
1.2.1	Genom- und Virusaufbau	4
1.2.1.1	Genomaufbau	4
1.2.1.2	Virusaufbau	6
1.2.2	Regulatorische Proteine.....	7
1.2.3	Akzessorische Proteine	8
1.2.4	Der Replikationszyklus von HIV	10
1.3	Inhibition der HIV-Replikation	13
1.3.1	Restriktion der HIV-Infektion durch zelluläre Abwehrmechanismen	14
1.3.1.1	Akute versus persistente Infektion mit HIV und HIV-Reservoirs	14
1.3.1.2	Zelluläre Inhibitoren der HIV Replikation	15
1.3.1.3	Risp/ Fam21 als zellulärer HIV-Inhibitor	18
1.3.2	Hemmung der HIV-Replikation durch exogene, antivirale Wirkstoffe	20
1.3.2.1	Klinisch angewandte Wirkstoffe und Limitierungen gegenwärtiger anti-HIV Therapien	20
1.3.2.2	Naturstoffe zur Inhibition von HIV	23
1.3.2.3	HIV-Zelleintritt als Ziel der Inhibitorforschung	25
1.4	Zielsetzungen dieser Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Materialien.....	27
2.1.1	HIV-Inhibitoren.....	27
2.1.2	Plasmide	27

Inhaltsverzeichnis

2.1.3	Prokaryotische Zellen.....	29
2.1.4	Humane Zellen	29
2.1.5	Infektiöse Virusüberstände.....	31
2.1.5.1	HIV-Laborstämme	31
2.1.5.2	Patienten-HIV-isolate	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1	Kultivierung und Aussaat humaner Zellen	32
2.2.1.2	Auftauen und Einfrieren humaner Zellen	32
2.2.1.3	Isolierung von mononukleären Zellen aus „Buffy-coats“	33
2.2.1.4	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Xtreme Gene™	34
2.2.1.5	Produktion von HI-Viren aus Laborstämmen, Ernte, Lagerung und Vorbereitung für Versuche	34
2.2.1.6	Produktion von HI-Viren die aus Patienten isoliert wurden	35
2.2.1.7	Produktion von lentiviralen Vektoren.....	35
2.2.1.8	Bestimmung der Gag-p24 Menge mittels ELISA	36
2.2.1.9	Das EASY-HIT System (Kremb et al. 2010)	36
2.2.1.10	Analyse mit dem Infinite M200 (Tecan).....	37
2.2.1.11	Viabilitäts-Test (MTT-Test).....	37
2.2.1.12	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für Analyse im FACSCanto II.....	38
2.2.1.13	Time-of-Addition Assay	38
2.2.1.14	Vorinkubationsassay	38
2.2.1.15	Isolierung von intakten Viruspartikeln mittels magnetischer Microbeads.....	39
2.2.1.16	Attachment-Assay und mikroskopische Analyse	39
2.2.1.17	HIV-RNA-Bestimmung	40
2.2.1.18	FACSCanto II Analyse und Auswertung	40
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41

2.2.2.1	Restriktionsverdau	41
2.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.2.3	Reinigung von DNA aus Agarosegelen über NucleoSpin® Extract II	42
2.2.2.4	PCR	42
2.2.2.5	Ligation.....	43
2.2.2.6	Transformation	44
2.2.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA.....	44
2.2.2.8	RNA-Isolation	45
2.2.2.9	qRT-PCR.....	45
2.2.3	Proteinanalytik.....	47
2.2.3.1	Ernte von Zellen für eine Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Westernblot	47
2.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.2.3.3	Westernblot	49
2.2.4	Herstellung pflanzlicher Extrakte.....	49
2.2.4.1	Bearbeitung des Cystus052®-Suds.....	49
2.2.4.2	Herstellung des <i>Cystus incanus</i> -Tee Extraktes (Ci Tee).....	50
2.2.4.3	Herstellung der Extrakte der lebenden <i>Cystus incanus</i> Pflanzen	50
2.2.4.4	Anreicherung der polyphenolischen Bestandteile aus Ci	50
2.2.4.5	Festphasenextraktion (SPE) von <i>Cystus incanus</i>	51
2.2.5	Statistik.....	51
2.2.6	Fraktionierung des Cystus052® Extraktes durch die Firma Bicol GmbH.....	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Untersuchung des Einflusses der zellulären HIV-1 Inhibitorfamilie Risp/ Fam21 auf die HIV-1 Replikation	52
3.1.1	Expressionsanalyse von Risp/Fam21 RNA-Transkripten in Zelllinien und primären Zellen	52
3.1.1.1	Etablierung eines qRT-PCR Assays	52

3.1.1.2	qRT-PCR Analyse der Risp/ Fam21 RNA Mengen in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen.....	55
3.1.2	Etablierung eines Systems zur Modulation der Risp/ Fam21 Expression.....	58
3.1.2.1	Konstrukte zur Modulation der Risp/ Fam21 Expression	58
3.1.2.2	Bestätigung der Funktionalität des Modulationssystems in persistent infizierten Astrozyten	60
3.1.3	Modulation der Risp/ Fam21 Expression in HIV-Zielzellen (T-Zellen).....	63
3.1.3.1	Knockdown und Überexpression von Risp/ Fam21 in Jurkat T-Zellen.....	63
3.1.3.2	Effekt auf die HIV-Replikation bei Modulation der Risp/ Fam21 Expression in T-Zellen	64
3.2	Anti-HIV Aktivität von Präparaten und Inhaltsstoffen aus der Arzneipflanze <i>Cistus incanus</i> sp (Ci)	67
3.2.1	Aktivität verschiedener Ci Präparationen und Verstärkung der anti-HIV Aktivität durch Polyphenolanreicherung.....	67
3.2.2	Wirkung von Ci Extrakten gegen HI-Viren mit unterschiedlichen Tropismen	71
3.2.3	Wirkung von Ci Extrakten gegen aus Patienten isolierte HIV-Stämme	72
3.2.4	Untersuchung des Wirkmechanismus von Ci	74
3.2.4.1	„Time-of-Addition“ Assay zur Eingrenzung des Wirkzeitpunkts.....	75
3.2.4.2	Attachment Assay	76
3.2.4.3	Präinkubationsexperiment und Isolierung von intakten Viruspartikeln mittels magnetischer Microbeads	79
3.2.5	„Bioassay-guided“ Fraktionierung von Ci zur Aufklärung der aktiven Inhaltsstoffe.....	82
4	Diskussion	87
4.1	Untersuchung des Einflusses der zellulären HIV-1 Inhibitorfamilie Risp/ Fam21 auf die HIV-1 Replikation	87
4.1.1	Nachweis der Expression von Risp/ Fam21 RNA-Transkripten in Zelllinien und primären Zellen.....	88
4.1.2	Etablierung eines Systems zur Modulation der Risp/ Fam21 Proteine	88
4.1.3	Effekte der Modulation der Risp/ Fam21 Expression auf die HIV Replikation in HIV-Zielzellen (T-Zellen)	89

4.1.4	Endogene anti-HIV Inhibierung durch Risp/ Fam21 Proteine.....	90
4.2	Anti-HIV Aktivität von Cistus incanus (Ci) Extrakten	91
4.2.1	Aktivität verschiedener Ci Präparationen und Verstärkung der anti-HIV Aktivität durch Polyphenolanreicherung.....	91
4.2.2	Wirkung von Ci Extrakten gegen Viren unterschiedlicher Typen und Gruppen und Validierung der anti-HIV Aktivität in PBMCs.....	92
4.2.3	Ci Extrakte zeigen anti-HIV Aktivität als Anheftungsinhibitoren	93
4.2.4	Bioassay-unterstützte Fraktionierung von Ci Extrakten.....	94
4.2.5	Ci als Phytotherapie gegen HIV und Ausblick	95
4.3	Eignung der untersuchten Ansätze als antiretrovirale Therapie	98
5	Zusammenfassung.....	100
6	Anhang.....	101
6.1.1	Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	101
6.1.2	Medien für die Kultivierung prokaryotischer Zellen	102
6.1.3	Chemikalien, Puffer und Kits.....	102
6.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	106
6.1.5	Geräte	107
6.1.6	Software	109
6.1.7	Antikörper	110
6.1.8	Verwendete Primer.....	110
7	Abkürzungen	123
8	Referenzen	128
9	Danksagung.....	144
10	Veröffentlichungen.....	145
11	Eidesstattliche Erklärung.....	146

1 Einleitung

Im Jahre 1981 wurde AIDS (acquired immunodeficiency syndrome; erworbenes Immundefektsyndrom) erstmals bei einer Gruppe homosexueller Männer mit schweren opportunistischen Krankheiten wie Lungenentzündungen oder Pilzinfektionen der Schleimhäute beschrieben. Diese Krankheiten gingen mit multiplen viralen Infektionen wie z.B. Cytomegalovirusinfektionen einher und die Patienten zeigten fehlende Immunantworten auf Antigene und eine starke Verringerung der Lymphozyten. Schon damals wurde davon ausgegangen, dass es sich um einen erworbenen T-Zell Defekt handelt (Gottlieb et al. 1981). Es wurde erkannt, dass sich die Krankheit über Blut oder Blutprodukte überträgt und es sich vermutlich um ein Virus handelt. Dieses Virus wurde HTLV-III (Humanes T-Zell Leukämie Virus) genannt, da es Verwandtschaft zu der bereits bekannten Retrovirusfamilie HTVL aufwies. Dies wurde 1983 unabhängig voneinander von Luc Montaigner und Françoise Barré-Sinoussi (Barré-Sinoussi et al. 1983) (Pasteur-Institut, Paris) als auch von Robert Gallo (Gallo et al. 1983) (National Cancer Institute, Bethesda) veröffentlicht und 1986 erhielt das Virus seinen heutigen Namen: HI-Virus oder kurz HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) (Coffin et al. 1986).

1.1 HIV als globales Gesundheitsproblem

Ende 2013 waren weltweit ca. 35 Millionen Menschen mit HIV infiziert (www.who.int/hiv/en/; 11.04.2015). Ein Großteil dieser Betroffenen kommt, wie in Abbildung 1 zu sehen, aus Afrika und anderen Ländern der Dritten Welt. In Südafrika, der am stärksten betroffenen Gegend, lebten Ende 2013 ca. 24,7 Millionen HIV-infizierte Menschen, was einem Prozentsatz von bis zu 28% der dortigen Bevölkerung entspricht.

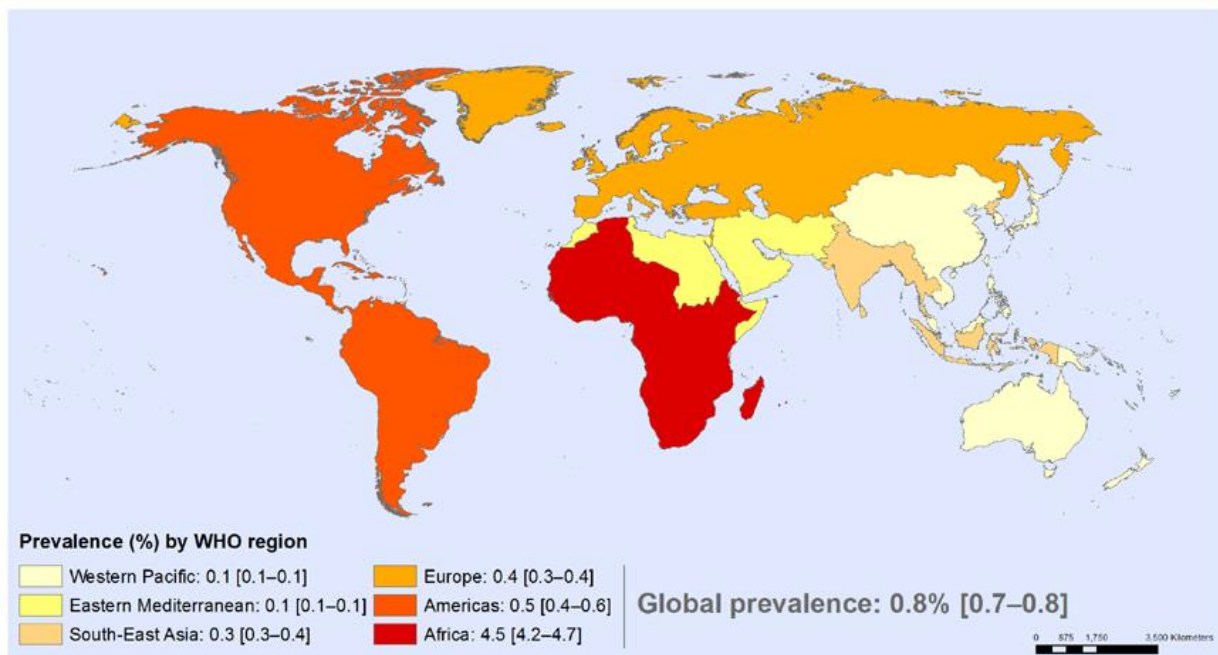


Abbildung 1: Globale Prävalenz von HIV in 2013. Quelle:
http://www.who.int/gho/hiv/hiv_013.jpg?ua=1; 11.04.2015

Die HIV-Neuinfektionsrate konnte zwar durch Aufklärung und antiretrovirale Therapie um bis zu 33% gesenkt werden (http://www.unaids.org/en/resources/documents/2013/JC2571_AIDS_by_the_numbers; 11.04.2015), jedoch gibt es jährlich noch ca. 2,1 Millionen Fälle an Neuinfektionen und 1,5 Millionen AIDS-assoziierte Todesfälle.

Obwohl die Anzahl der Menschen, die antiretrovirale Therapie erhalten, seit 2005 von weniger als 1,3 Millionen Menschen auf mehr als 12,9 Millionen Menschen in 2013 gestiegen ist, ist die Anzahl der Menschen in Dritte-Welt-Ländern, die eine Therapie benötigen, noch deutlich höher. Laut Schätzungen der WHO und UNAIDS wären mindestens ca. 28 Millionen Menschen antiretrovirale Therapie benötigen (www.who.int/hiv/en/; 11.04.2015).

Jedoch ist gerade in den Ländern mit der höchsten HIV-Prävalenz eine umfassende Behandlung der HIV-Infektion nicht möglich, da die Kosten der HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) in diesen Ländern nicht in ausreichendem Umfang bewältigt werden können. Die Kosten nur für HAART belaufen sich, je nach Krankheitsstadium der betroffenen Person, auf 10.000-20.000 US\$ pro Jahr (Gebo et al. 2010). Durch die Entwicklung von Generika-Medikamenten sind die Kosten für HAART zwar drastisch gesunken, jedoch betragen die Monatskosten für HAART in z.B. Indien momentan immer noch ca. 20 US\$ was jedoch für die Betroffenen, die in diesem Land von zum Teil weniger als 1 US\$ am Tag auskommen müssen, immer noch ein sehr hoher Betrag ist (Kumarasamy et al. 2006).

Eine Reihe an weiteren Aspekten führt zu zusätzlichen Kosten: Versorgung durch medizinisches Personal, Behandlung von opportunistischen Infektionen die durch die Schwächung des Immunsystems häufig vorkommen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*-, Hepatitis B- oder Herpesvirus-Infektionen) (Banerjee 2005), sowie die Behandlung der Nebenwirkungen der antiviralen Medikamente wie Übelkeit, Lipodystrophien oder Neuropathien (Chesney 2003, Burgoyne and Tan 2008). Eine zusätzliche Bedrohung bei der Infektion mit HIV ist das Auftreten sogenannter opportunistischer Krankheiten wie zum Beispiel HIV-assoziierte Karzinome: Kaposi Sarkome, Non-Hodgkin-Lymphome und Gebärmutterhalskrebs. Eine neuere Erscheinung ist das vermehrte Auftreten von weiteren Krebsarten wie Lungen-, Brust-, Anal-, Haut-, Leber- und Prostatakrebs sowie auch hämopoetische, bösartige Tumore (Hodgkin Lymphome), Leukämien und andere Krebsarten wie Melanome, Sarkome und Keimzelltumore. Zwischen 1991 und 1995 waren 31,4% der in der HIV-Population auftretenden Krebsarten aus der Gruppe der oben genannten Tumore, wohingegen in dem Zeitraum 1996-2002 schon 58% der Tumore aus dieser Gruppe stammen (Mitsuyasu 2013). Der Anstieg der Fälle an diesen Krebsarten wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass erstens Menschen die mit HIV/ AIDS leben, durch die Schwächung des Immunsystems unverhältnismäßig oft Infektionen mit anderen z.T. onkogenen Viren wie z.B. humane Papillomviren, Hepatitis B und C und Epstein-Barr Virus aufweisen. Zweitens nimmt durch die Einführung der HAART-Therapie die Population der an HIV-infizierten Menschen zu und gleichzeitig tritt auch ein Altern dieser Population ein (Pantanowitz et al. 2006, Shebl et al. 2012). Weitere durch HIV-Infektion ausgelöste opportunistische Krankheiten können auch das Herz-Kreislaufsystem (koronare Herzkrankheit) (Boccard et al. 2013) oder das Gehirn betreffen wie z.B. progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML), Kryptokokkenmeningitis oder toxoplasmatische Enzephalitis (Tan et al. 2012).

1.2 Das HI-Virus

HIV ist ein Virus der Familie der Retroviren. Genauer gehört HIV in die Unterfamilie der Orthoretroviren welche aus sechs Gattungen besteht, darunter die Lentiviren. Die Gattung Lentiviren beinhaltet neben HIV noch weitere Immundefizienz-auslösende Viren wie das bovine, feline oder auch das simiane Immundefizienzvirus (Foley 2000). Retroviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre Erbinformation, die als Einzelstrang-RNA vorliegt, durch das Enzym Reverse Transkriptase in eine Doppelstrang-DNA umschreiben kann, welche daraufhin stabil in das Genom des Wirtes – im Falle von HIV das menschliche – eingebaut werden kann. HIV kann in zwei Typen unterteilt werden: HIV-1 und HIV-2. HIV-1 ist der am weitesten verbreitete Typ, wohingegen HIV-2 hauptsächlich im westlichen Afrika auftritt (Kanki et al. 1994). Beide Virustypen sind durch eine

speziesübergreifende Übertragung von Primaten-infizierenden Lentiviren auf den Menschen entstanden (Sharp et al. 1995). Bei HIV-2 fanden Übertragungen von SIV (Simianes Immundefizienzvirus) auf den Menschen von Rußmangaben statt (Gao et al. 1992), wohingegen bei HIV-1 die Transmission von SIV_{CPZ} (Simianes Immundefizienz-Virus Schimpanse) auf den Menschen über Schimpansen bzw. Gorillas stattgefunden hat (Gao et al. 1999, Lihana et al. 2012). Beide Typen sind pathogen für Menschen, jedoch ist der Krankheitsverlauf bei HIV-2 etwas milder und langsamer, was sich darin äußert, dass die Wahrscheinlichkeit durch eine Infektion mit HIV-1 AIDS zu entwickeln 11-mal höher ist als durch HIV-2 (De Cock et al. 1993, Kanki et al. 1994, Sharp and Hahn 2011). HIV-1 kann des Weiteren in die Gruppen M, N, O und P unterteilt werden, wobei M, auch Major-Gruppe genannt, die weltweit am weitesten verbreitete HIV-1 Untergruppe darstellt (McCutchan 2006). HIV-1 M und auch HIV-1 N entstanden vermutlich durch die Übertragung von SIV aus Schimpansen, wobei HIV-1 N jedoch nur, bis auf eine Ausnahme, in Kamerun nachgewiesen wurde (Delaugerre et al. 2011). HIV-1 O (Outlier) wurde bisher hauptsächlich in Kamerun und West Afrika isoliert (Gürtler et al. 1994, Depatureaux et al. 2011). HIV-1 P wurde als eine neue Gruppe klassifiziert, bei der SIV von Gorillas auf den Menschen übertragen wurde (Plantier et al. 2009). Die Gruppe M wiederum kann in mehrere Subgruppen („Clades“) eingeteilt werden: A,B,C,D,F,G,H,J und K (McCutchan 2006). Es gibt des Weiteren die Möglichkeit, dass sich HIV-1 Viren von zwei verschiedenen Subtypen in einem Patienten kreuzen und ihr Genom gemischt wird. Normalerweise sind solche Viren nicht überlebensfähig, aber wenn diese Viren in mehr als einem Patienten beobachtet werden, werden sie zirkulierende, rekombinante Formen genannt (CRF, circulating recombinant form) (Sabino et al. 1994, Nájera et al. 2002, Filho et al. 2006). HIV-2 kann in die Subgruppen A bis H unterteilt werden, wobei nur die Subgruppen A und B in mehr als einem Patienten nachzuweisen waren (Gao et al. 1994, Damond et al. 2004).

1.2.1 Genom- und Virusaufbau

1.2.1.1 Genomaufbau

Das Genom der Retroviren (vergl. Abbildung 2) besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül, welches vollständige 5'Cap-Strukturen und 3'Polyadenylierungs-Strukturen aufweist, wie es sie auch bei eukaryotischer mRNA gibt (Watts et al. 2009). Der HIV-Viruspartikel enthält zwei Kopien dieser RNA-Genome. Nach dem Eintritt des Virus in die Zellen werden diese RNA-Genome in doppelsträngige DNA-Moleküle umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. Diese DNA-Moleküle werden dann Provirus genannt, umfassen 9719 Basenpaare und enthalten neun offene Leseraster (ORF; open reading frames) die u.a. für die Genprodukte Gag (Strukturproteine;

gruppenspezifische Antigene), Pol (virale Enzyme: Integrase, Protease, Reverse Transkriptase und RNase H) und Env (Oberflächenproteine) kodieren. Zusätzlich besitzt das HI-Virus noch weitere Leseraster, die für akzessorische (Nef, Vif, Vpr, Vpu) und regulatorische (Tat, Rev) Proteine kodieren (Frankel and Young 1998). Das HIV-2 Genom kodiert nicht für das akzessorische Protein Vpu, jedoch für ein zusätzliches Protein, genannt Vpx (Tristem et al. 1998). Die HIV-Proteine entstehen aus den Vorlagen von ein- oder mehrfach gespleißten mRNAs. Für das Spleißen der HIV mRNA-Moleküle gibt es vier unterschiedliche 5' Spleißstellen und acht 3' Spleißstellen. Mit Hilfe dieser unterschiedlichen Spleißvarianten können mehr als 40 unterschiedlich gespleißte mRNAs produziert werden. Dazu gehören zum Beispiel ungespleißte mRNAs, die entweder als genomische RNA für neue Viren verwendet werden können oder als mRNA für Gag und Gag-Pol Proteine kodieren, mehrfach gespleißte mRNAs die für Env, Vpu, Vif und Vpr kodieren sowie auch komplett gespleißte mRNAs die für Rev, Tat und Nef kodieren (Tazi et al. 2010, Karn and Stoltzfus 2012). Flankiert werden die kodierenden Regionen im genomischen Provirus von regulatorischen Sequenzen, den LTR-Regionen. Diese LTR-Regionen (long terminal repeats) bestehen aus den Abschnitten U3, R und U5, die an beiden proviralen Enden in gleicher Orientierung vorliegen. Die 5' LTR dient als Promoter für die Transkription der viralen RNAs und enthält mehrere funktionelle Regionen: Promoter-, Enhancer- und modulatorische Regionen sowie das TAR-Element (transactivation response element). Die Promoter-, Enhancer- und modulatorischen Regionen sind alle in der U3 Region zu finden und enthalten Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren wie z.B. Sp1, AP-1, NF-AT oder NF-κB die für die Initiation der Transkription rekrutiert werden (Gaynor 1992, Freed 2001, Watts et al. 2009). Das TAR-Element (Trans-activation response element), ein RNA-Element, fungiert während der Transkription in den frisch gebildeten RNA-Fragmenten als Tat-Bindestelle und ist in dem Abschnitt R direkt 3' des Transkriptionsstarts zu finden. Sobald die TAR-Sequenz transkribiert wurde, kann Tat an dieses Element auf der frisch gebildeten RNA binden. Die U5 Region ist von Bedeutung für die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom (Pereira et al. 2000). Direkt anschließend an den U5-Abschnitt befindet sich die Primer Bindestelle, eine Sequenz an die die zelluläre tRNA^{Lys} bindet, welche als Primer für die Synthese des ersten DNA-Stranges bei der reversen Transkription dient. Nach der Primer Bindestelle folgt noch die sog. 'leader region', welche den Hauptspleißdonor enthält. Dieser Hauptspleißdonor wird für das Spleißen sämtlicher Transkripte verwendet (Mueller et al. 2014). In dieser 'leader region' befindet sich auch noch ein Verpackungssignal, durch welches die RNA-Genome an die Nukleokapsidsequenz des Gag-Vorläuferproteins gebunden werden, um die Verpackung in Viruspartikel zu gewährleisten (Heng et al. 2012).

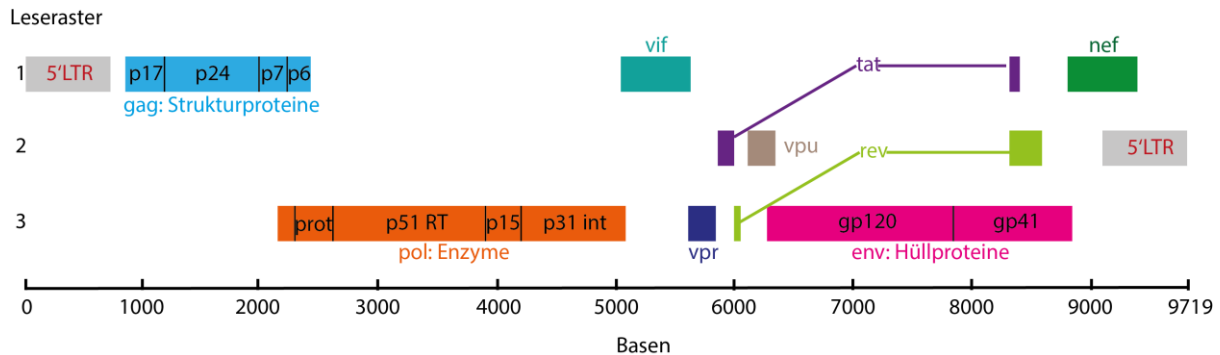


Abbildung 2: Schematische Darstellung des proviralen HIV-1 Genoms und der Leseraster, die für die viralen Proteine kodieren. Das provirale HIV-Genom hat eine Größe von 9719 Basenpaaren und es enthält drei Bereiche, die für die Strukturproteine (gag), die Enzyme (pol) und die Hüllproteine (env) kodieren. Der gag Bereich kodiert für folgende Proteine: p17 – Matrixprotein, p24 – Kapsidprotein, p7 – Nucleokapsidprotein, p6 Protein. Der pol Bereich kodiert für folgende Enzyme: p11 – Protease, p51/p15 – Reverse Transkriptase/ RNaseH, p31 – Integrase. Der env Bereich kodiert für folgende Hüllproteine: gp120 – Oberflächenprotein, gp41 – Transmembranprotein. Zusätzlich kodiert das HIV Genom noch für regulatorische (Tat, Rev) und akzessorische Proteine (Vif, Vpr, Vpu, Nef). HIV-2 kodiert noch zusätzlich für Vpx und es gibt keinen Leseraster der für Vpu kodiert.

1.2.1.2 Virusaufbau

Die sphärische Hülle der Viruspartikel besteht aus einer Hüllmembran, die von der Cytoplasmamembran der Wirtszellen abgeleitet ist und einen Durchmesser von etwa 100 - 120nm aufweist. Diese Hüllmembran wird von Transmembranproteinen (gp41) durchspannt, welche wiederum an der Außenseite der Partikel mit den externen Glykoproteinen (gp120) nicht-kovalent verbunden sind (Chan et al. 1997, Wyatt et al. 1998). Diese zwei Proteine werden durch proteolytische Spaltung eines gp160 Vorgängerproteins gebildet und bei dem Transport über das ER an die Zelloberfläche z.T. stark glykosyliert (Willey et al. 1988, Earl et al. 1991, Mao et al. 2013). Auf der Oberfläche der Viren liegen die gp41-gp120 Heterodimere als Trimere vor, die durch diese Anordnung sogenannte ‚Spikes‘ ausbilden (Tran et al. 2012). Auf den Virionen lassen sich zwischen 8 und 14 dieser Spikes finden, die einen Durchmesser von 110-120Å aufweisen und 120-140 Å von der virusoberfläche hervortreten (Haqqani and Tilton 2013). An der Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine p17 verankert und bilden eine netzartige Struktur aus, die den Viren ihre Form und Stabilität verleiht. Im Inneren des Virus befindet sich das Kapsid, welches im reifen Viruspartikel eine konische Struktur aufweist und aus dem Kapsidprotein p24 aufgebaut ist (Gelderblom et al. 1987). Das Kapsid beinhaltet zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle, die von Nucleokapsidproteinen p7 und mit der Reversen Transkriptase/ RNase H komplexiert ist. Zusätzlich enthält das Kapsid noch die Enzyme Protease und Integrase. Die Reverse Transkriptase ist dafür zuständig, die RNA in einen

DNA-Doppelstrang umzuschreiben. Die Protease spaltet sich selbst autokatalytisch aus dem Pol-Polyprotein und prozessiert dieses daraufhin. Verpackt in neue Partikel spaltet sie das Gag Polyprotein und sorgt somit für die Reifung der Viren hin zu infektiösen Partikeln. Die Integrase vermittelt den Einbau der viralen DNA in das Wirtszellgenom. Des Weiteren sind im oder assoziiert mit dem Kapsid auch die akzessorischen Proteine Vpr, Nef und Vif zu finden (Frankel and Young 1998). Das Kapsid wird über Linker-Proteine (p6) mit der Hüllmembran verbunden (Abbildung 3) (Frankel and Young 1998, Watts et al. 2009).

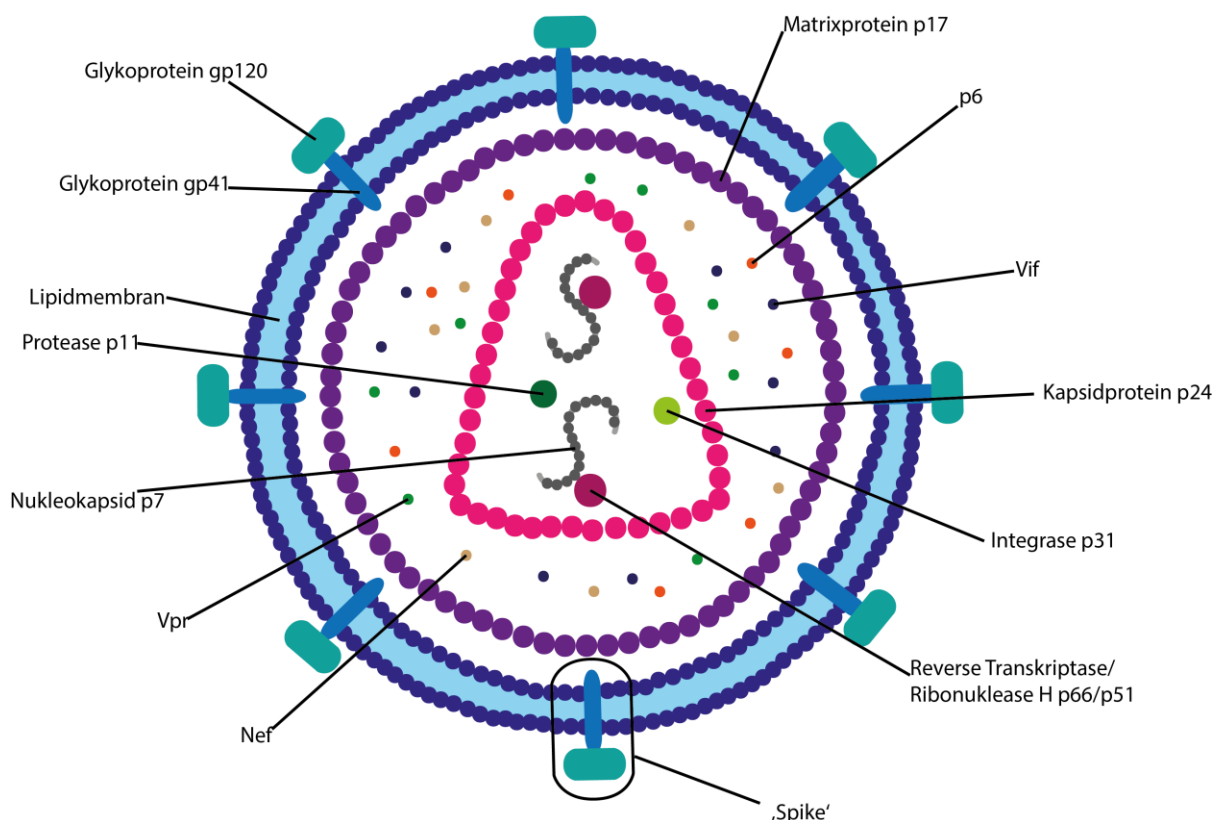


Abbildung 3: Aufbau des reifen HI-Virus. Im Inneren des HIV-Kapsids sind zwei Einzelstrang RNA-Moleküle. Diese sind gebunden an das Nucleokapsidprotein p7. Das Kapsid wird aus dem Kapsidprotein p24 gebildet und enthält zusätzlich noch die Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase. Die nächste Schicht, die das Kapsid umgibt und nach Außen mit der Lipidmembran verknüpft ist, ist die HIV-Matrix, welche aus dem Matrixprotein p17 gebildet wird. In dem Raum zwischen Kapsid und Hülle befinden sich noch weitere virale Proteine: p6, Vif, Vpr und Nef. Die Lipidmembran stammt von der Wirtszelle ab und enthält Spikes, die von den HIV Env Proteinen gp41 und gp120 gebildet werden.

1.2.2 Regulatorische Proteine

Bei den regulatorischen Proteinen handelt es sich um Transaktivatoren, die sowohl transkriptionell (Tat) als auch posttranskriptionell (Rev) aktiv sind und nicht in Viruspartikel verpackt werden.

Tat

Das Tat-Protein (transactivator of transcription) wird als frühes Virusprotein während des Infektionszyklus gebildet und zwar als eines der ersten Produkte der beginnenden Transkription. Tat erfüllt seine transaktivierende Funktion im Zellkern. Das Tat-Protein bindet an das TAR-Element (trans-activation response) am 5'Ende der neusynthetisierten RNA. Eine wichtige Aktivität von Tat ist die Rekrutierung des positiven Elongationsfaktors κ (pTEFb). Die Bindung von pTEFb an Tat/TAR führt über Zwischenschritte zu einer Hyperphosphorylierung von v.a. der carboxy-terminalen Domäne (CTD) der RNA Polymerase II (RNA Pol II) und dadurch zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms. Dadurch wird die Transkription des HIV-Genoms um ein Vielfaches amplifiziert (Harrich et al. 2006, Karn and Stoltzfus 2012).

Rev

Wie schon erwähnt, ist das Rev-Protein (regulator of expression of virion proteins) ein posttranskriptionell wirkender Regulator. Die Bildung des Rev-Proteins erfolgt wie bei Tat früh während der Replikation. Rev bindet an die RRE-Sequenz (rev response element) der späten viralen mRNAs im Zellkern und vermittelt ihren Transport in das Zytoplasma durch die Rekrutierung des nukleären Exportfaktors CRM1. Erfolgt kein Transport in das Zytoplasma, werden die mRNA-Spezies weiter prozessiert und abgebaut (Pollard and Malim 1998, Karn and Stoltzfus 2012). Zusätzlich hat Rev auch Einfluss auf das Spleißen, die Stabilität und die Translation der viralen RNAs (Felber et al. 1989, Kammler et al. 2006, Groom et al. 2009).

1.2.3 Akzessorische Proteine

HIV-1 codiert des Weiteren für vier verschiedene akzessorische Proteine: Vpu, Vif, Vpr und Nef und HIV-2 codiert noch für ein zusätzliches akzessorisches Protein: Vpx. Diesen Proteinen wird eine Vielzahl von Aktivitäten zugeschrieben. Dabei weisen sie jedoch keinerlei enzymatische Aktivität auf, sondern haben hauptsächlich regulatorische Funktionen inne, die bei der *in vivo* Infektion der Zelle eine Rolle spielen. Dabei dienen sie zugleich auch als Adaptoren für zelluläre Proteine, was eine wichtige Funktion in der Abwehr gegen zelluläre Restriktionsfaktoren darstellt (Strebel 2013, Collins and Collins 2014).

Vpr (Virales Protein R)

Vpr wird sehr früh nach der Infektion in den Zellkern transportiert (Heinzinger et al. 1994) und ihm werden mindestens vier bestimmte Funktionen zugeschrieben: Vpr ist beteiligt bei dem Transport

des Präintegrationskomplexes in den Zellkern (Heinzinger et al. 1994) und es führt zu einem Arrest der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus wodurch die virale Replikation erleichtert werden soll (Jowett et al. 1995). Vpr induziert Apoptose durch Erniedrigen des mitochondrialen Membranpotentials (Jacotot et al. 2001) und schließlich wirkt Vpr auch als Aktivator der Transkription zellulärer und viraler Promotoren (Cohen et al. 1990, Guenzel et al. 2014).

Vif (Virionen infektitäts-Faktor)

HIV-Vif erhielt seinen Namen Virionen-infektitäts-Faktor aufgrund der Tatsache, dass bei dessen Deletion ein Verlust der Virusinfektiösität zu verzeichnen war (Strebel et al. 1987). Dieser Effekt war jedoch Zellspezifisch und wurde daraufhin genauer untersucht. Dabei wurde das zelluläre Protein APOBEC3G entdeckt. Vif spielt vor allem bei der Replikation in primären T-Zellen und Macrophagen eine große Rolle, da es in diesen Zellen der Aktivität des zellulären HIV Inhibitorproteins APOBEC3G entgegenwirken kann (1.3.1.2). Zusätzlich scheint Vif auch Funktionen als Protein- und RNA-Chaperon bei dem Zusammenbau von neuen Viren zu besitzen (Batisse et al. 2012).

Vpu (Virales Protein U; nur HIV-1)

Vpu ist wichtig für die virale Abwehr gegen den zellulären Restriktionsfaktor Tetherin, der Viruspartikel an der Zelloberfläche festhält. Vpu führt zu einer Herabregulierung der Expression dieses Proteins auf der Zelloberfläche und fördert damit die Freisetzung der Viruspartikel (Neil et al. 2008, Van Damme et al. 2008).

Nef

Nef spielt eine große Rolle bei der Pathogenität von HIV, und übt dabei einige sehr wichtige Funktionen aus. Zum Beispiel werden Nef folgende Funktionen zugeschrieben: CD4-Herunterregulierung, MHC-Klasse I Herunterregulierung, Zellaktivierung und Verstärkung der HIV-1 Infektiösität (Foster and Garcia 2008). Sehr interessant ist auch die Tatsache, dass ein Nef-deletiertes, attenuiertes Virus zur möglichen Impfung untersucht wurde, weil eine Gruppe von Long-term non-progressors (HIV-positive Patienten, die ohne Therapie keine hohe Viruslast entwickeln) ein Virus in sich trugen, welches Deletionsmutationen im nef-Gen aufwies (Kondo et al. 2005).

Vpx (Virales Protein X;nur HIV-2)

Vpx wurden zu Beginn dieselben Funktionen, wie z.B. nukleärer Import von viraler DNA, zugeschrieben wie Vpr, da Vpx vermutlich durch Genduplikation von Vpr entstanden ist, jedoch wird

die genaue Funktion noch diskutiert (Goujon et al. 2008). Eine interessante Funktion von Vpx ist allerdings, dass es den HIV-1 Restriktionsfaktor SamHD1 ubiquitinieren kann, was zum proteasomalen Abbau von SamHD1 und schließlich zu einer effizienteren HIV-1 Infektion führt (Laguette et al. 2011).

1.2.4 Der Replikationszyklus von HIV

Eine Übersicht über den Replikationszyklus von HIV ist in Abbildung 4 gezeigt. HIV infiziert primär Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten, Monozyten und Macrophagen, die die Oberflächenproteine CD4 und die als Corezeptoren dienenden Proteine CCR5 oder CXCR4 tragen. In einem ersten Schritt findet eine unspezifische Annäherung des Virus an die Zelloberfläche statt, indem die gp41/gp120 Trimere unspezifisch mit negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Zelloberfläche interagieren oder durch die schon etwas spezifischere Interaktion von HIV Env mit z.B. $\alpha 4\beta 7$ -Integrinen (Klasse 2012, Wilen et al. 2012). Nach diesem ersten Kontakt und der dadurch entstehenden Annäherung zwischen Virus und Zielzelle, wird die Bindung über das externe Membranprotein gp120 des Virus an den CD4-Oberflächenrezeptor und an einen der Corezeptoren CCR5 oder CXCR4 der Zielzellen vermittelt. Dabei nutzen X4-trope Viren hauptsächlich den CXCR4-Corezeptor und R5-trope Viren hauptsächlich den CCR5-Corezeptor (Berger et al. 1999). Die Membranen der Zelle und des Virions fusionieren, katalysiert durch die Umlagerung von gp41 und das Kapsid wird in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen (Freed 2001, Wilen et al. 2012). Das Kapsid zerfällt (zumindest teilweise), wodurch die Enzyme Reverse Transkriptase, Protease, Integrase und die RNA-Moleküle in das Zytoplasma gelangen. Ist dies geschehen, kann die Reverse Transkriptase damit beginnen, die einzelsträngigen RNA-Moleküle erst in RNA-DNA-Hybridstränge und dann in doppelsträngige DNA-Stränge umzuschreiben (Whitcomb and Hughes 1992, Hu and Hughes 2012). Im Anschluss können dann diese Doppelstränge in den Nukleus transportiert werden, um dort mit Hilfe der Integrase in das Wirtszellgenom integriert zu werden (Delelis et al. 2008). Bei der Transkription entsteht zuerst die komplette virale Vorläufer-RNA, aus der verschiedene Transkripte durch alternatives Spleißen entstehen können. In der frühen Phase der Expression werden hauptsächlich mehrfach gespleißte mRNAs, die für regulatorische Proteine wie Tat und Rev kodieren, gebildet (Strebel 2003, Karn and Stoltzfus 2012). Erst in einer späteren Phase werden auch einfach und ungespleißte mRNAs, die z.B. für die Bildung der Viren benötigten Strukturproteine kodieren, gebildet. Diese Transkripte werden mit Hilfe des Rev Proteins, welches an das RRE-Segment auf den einfach- und ungespleißten mRNAs bindet, über zelluläre Exportmechanismen aus dem Zellkern exportiert (Pollard and Malim 1998, Karn and Stoltzfus 2012). Aus diesen Transkripten werden im Zytoplasma alle Proteine und Enzyme translatiert, die für die Bildung neuer Viruspartikel

benötigt werden. Dabei entstehen unter anderem Gag-Vorläuferproteine, die direkt in die Virionen verpackt werden und Gag-Pol- bzw. Pol- Vorläufer- oder auch Polyproteine, aus denen sich die Protease zuerst autokatalytisch selbst herausschneidet und danach die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase prozessiert. Das Env Polyprotein wird bei der Bildung des gp120 und des gp41 im Golgi-Apparat von der zellulären Furinprotease in seine zwei Untereinheiten gespalten. Nach der Spaltung bleibt gp120 nicht-kovalent mit dem Membran-durchspannenden gp41 verbunden (Pierson and Doms 2003) und aggregiert auf der Zelloberfläche in Trimeren. Alle viralen Bestandteile die verpackt werden sollen, werden zur Plasmamembran in spezielle Mikrodomänen transportiert, aus welchen daraufhin die neuen Viren gebildet werden. Das HIV-1 Gag und auch das Gag-Pro-Pol Polyprotein führt durch seine Bindung an die Plasmamembran zu seiner Anreicherung in diesen Mikrodomänen und rekrutiert zugleich auch die zwei Einzelstrang-RNA Moleküle. Durch Konformationsänderungen in Gag werden alle diese Prozesse eingeleitet und schließlich können die Virionen durch einen zelleigenen Mechanismus (ESCRT; endosomal sorting complex required for transport) von der Zelloberfläche budden (Sundquist and Kräusslich 2012). In den frisch freigesetzten Virionen wird dann wiederum die Protease aktiv und spaltet das Gag-Polyprotein in das Kapsidprotein p24, das Matrixprotein p17, das Nucleokapsidprotein p7 und Protein p6 (Freed 2001, Adamson and Freed 2010, Sundquist and Kräusslich 2012).

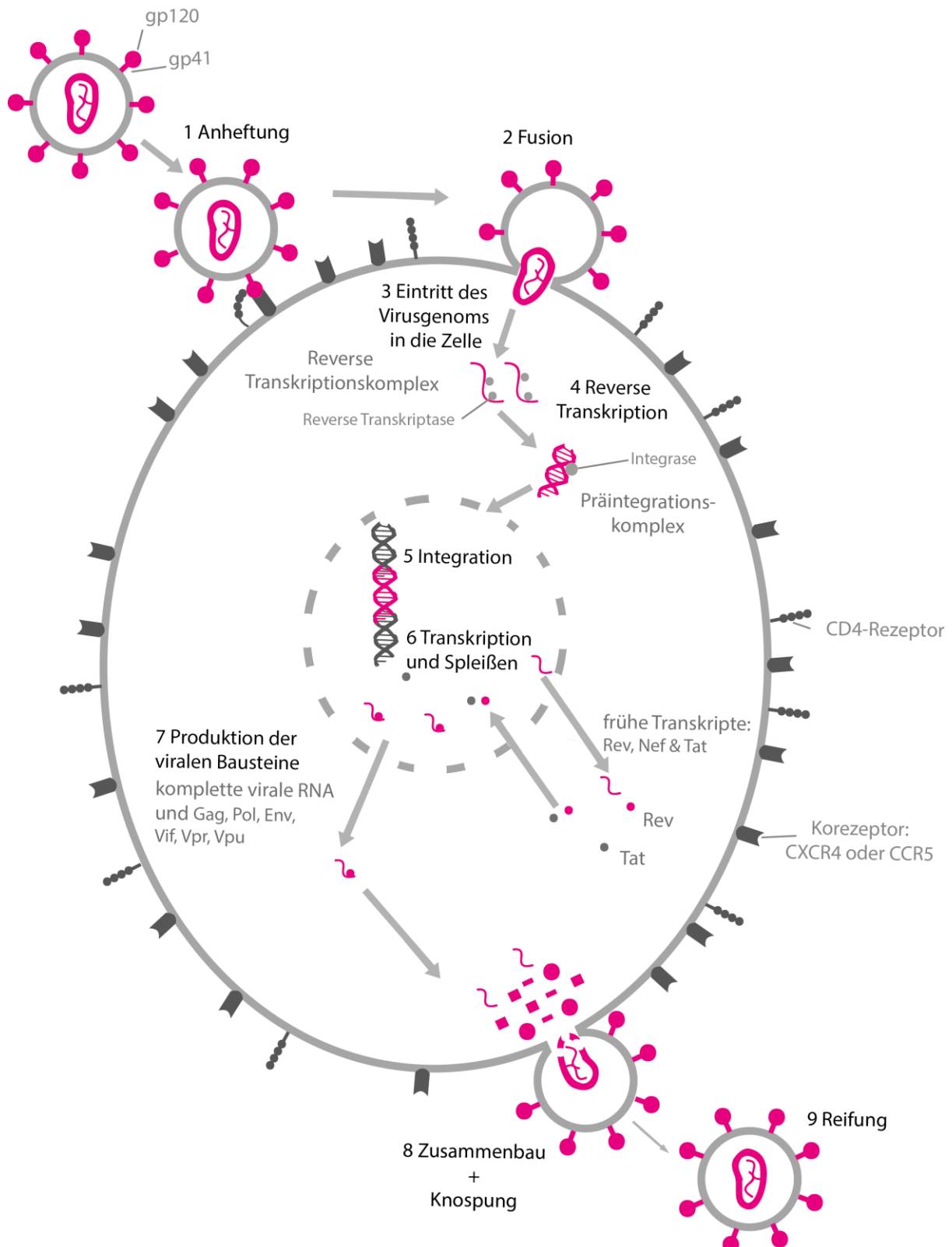


Abbildung 4: Der HIV-Replikationszyklus. Das Virus nimmt Kontakt mit der Zielzelle auf (1 Anheftung), bindet an CD4 und einen der Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 auf der Zelloberfläche und verschmilzt mit der Zelle (2 Fusion). Das HIV-Kapsid wird in das Zytoplasma transportiert, ausgepackt

und zerfällt teilweise, wodurch die viralen RNA Genome in das Zytoplasma gelangen (3 Eintritt des Virusgenoms in die Zelle). Die virale RNA wird durch reverse Transkription in die provirale DNA umgeschrieben (4 Reverse Transkription). Die provirale DNA wird als Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert und integriert dort in die Wirts-DNA (5 Integration). Anschließend startet die Transkription der viralen RNA (6 Transkription). Komplett-gespleißte mRNA wird im Zytoplasma in die frühen HIV-Proteine Rev, Nef und Tat translatiert (7 Translation). Rev wird wieder in den Zellkern transportiert wo es den Transport der späten, einfach- oder ungespleißten HIV mRNAs Gag, Pol, Env, Vif, Vpr und Vpu und der kompletten viralen RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma vermittelt. An der Zellmembran werden schließlich die neuen Viruspartikel zusammengebaut, welche von der Zelle abknospen (8 Zusammenbau und Knospung) und dann durch die Aktivität der viralen Protease nachreifen um schließlich neue Zellen infizieren zu können (9 Reifung).

1.3 Inhibition der HIV-Replikation

Bislang gibt es noch keine therapeutisch umsetzbare Möglichkeit eine Infektion mit HIV zu heilen, wobei bei einer Heilung davon gesprochen wird, dass die Virusproduktion in HIV-infizierten Personen so weit unterdrückt wird, dass auch ohne antiretrovirale Therapie dauerhaft keine Viruspartikel im Blut gefunden werden können (Katlama et al. 2013, Fauci et al. 2014). Ein Einzelfall, bei dem eine anscheinende Heilung gelang, dem berühmten ‚Berliner Patienten‘, wurde durch eine zusätzliche Krebserkrankung eine allogene, hämatopoetische Stammzelltransplantation notwendig, wozu ein Spender mit einer homozygoten Mutation in dem Gen für den CCR5-Rezeptor verwendet wurde. Durch diese Maßnahme zeigt dieser Patient bis heute keine im Körper zirkulierenden Viruspartikel mehr (Hütter et al. 2009, Allers et al. 2011, Yukl et al. 2013, Brown 2015). Dieser Fall ist jedoch eine Ausnahme und eine Knochenmarkstransplantation ist keine therapeutische Maßnahme, die für die Masse an HIV-infizierte Personen umsetzbar ist. Zusätzlich dazu darf die Tatsache nicht vergessen werden, dass bei einer HIV-Infektion sogenannte HIV-Reservoirs gebildet werden, welche in den infizierten Individuen persistieren und jederzeit zu einem Wiederausbruch der Krankheit führen können (1.3.1.1). Bisher konnte auch kein Impfstoff zum Schutz vor einer HIV-Infektion entwickelt werden. Deshalb ist weiterführende Forschung notwendig, um andere Alternativen der Inhibierung der HIV-Replikation zu finden. Dazu gehört zu Beispiel die Untersuchung endogener Abwehrmechanismen gegen HIV, den so genannten zellulären HIV-Inhibitoren (1.3.1). Es wurde bekannt, dass einige dieser Faktoren in bestimmten Zellen zu einer Inhibierung oder zumindest Herabregulierung der HIV-Infektion führen können und die Möglichkeit einer Ausweitung dieser Aktivität auch auf andere Zelltypen wird untersucht. Zusätzlich ist auch die Suche nach neuen HIV-Inhibitoren für die antiretrovirale Therapie (ART) (1.3.2) immer noch von großer Bedeutung. Es gibt mehrere Gründe, die es nötig machen, trotz des bereits bestehenden Arsenal an anti-HIV-Medikamenten, immer weiter nach neuen Inhibitoren zu suchen. Zum Beispiel findet auch bei HIV-

infizierten Individuen, die antiretrovirale Therapie erhalten, immernoch ein geringes Maß an Virusproduktion statt (Palmer et al. 2008, Sigal et al. 2011). Also ist die bisher verwendete Therapie nicht in der Lage, eine komplette Inhibition der Virusproduktion zu erreichen. Hinzu kommt, dass die rasche Mutationsrate des Virus zu einer schnellen Ausbildung von Resistenzen gegen die bekannten Medikamente führt (Clavel and Hance 2004). Zusätzlich verursachen die bisher bekannten, teuren Medikamente hohe Kosten bei der antiretroviralen Therapie, wodurch neue, günstigere Alternativen von Vorteil wären (Kumarasamy et al. 2006, Gebo et al. 2010). Auch die Behandlung der durch die Medikamente ausgelösten Nebenwirkungen verursacht den Patienten einerseits Mühen und kann zum Abbruch der antiretroviralen Therapie führen, sowie auch zu zusätzlichen Kosten in der Behandlung und somit wären Medikamente ohne Nebenwirkungen wünschenswert (Al-Dakkak et al. 2013).

1.3.1 Restriktion der HIV-Infektion durch zelluläre Abwehrmechanismen

Gerade in den letzten Jahren hat die Suche nach alternativen Mechanismen, um HIV zu inhibieren, stark zugenommen und dabei im Speziellen die Untersuchung der zellulären Abwehrmechanismen. Es ist bekannt, dass die HIV-Replikation bzw. die Virusproduktion in einigen Zellen unterdrückt wird und als möglicher Grund hierfür sind zelluläre, virale Inhibitoren in den Fokus der Forschung geraten.

1.3.1.1 Akute versus persistente Infektion mit HIV und HIV-Reservoirs

Nach der Infektion mit HIV zeigen CD4⁺ T-Zellen eine akute HIV-Infektion mit starker HIV-Replikation, sowie Freisetzung von frischen Viruspartikeln die die Infektion propagieren. Mit Hilfe körpereigener Abwehrmechanismen durch das Immunsystem oder zytopathische Effekte werden infizierte Zellen abgetötet oder gehen in Apoptose über und können somit keine neuen Viren mehr produzieren (Laurent-Crawford et al. 1991). Jedoch führen die in der Zwischenzeit gebildeten Viren zu einer Verbreitung der Infektion im gesamten Körper einer HIV-infizierten Person. Bei den aktiv HIV-produzierenden Zellen handelt es sich typischerweise um aktivierte CD4⁺ T-Zellen (Douek et al. 2002). Ein Grund für die Entwicklung einer persistenten Infektion ist die Tatsache, dass sich latent infizierte Zellen bilden, die ein replikationskompetentes Virusgenom besitzen, jedoch keine, oder nur geringe, HIV-Produktion betreiben. Diese Zellen zeigen eine längere Lebensdauer als diejenigen Zellen, die eine akute Infektion aufweisen (Blankson et al. 2002). Auch infizierte, ruhende CD4⁺ T-Zellen können in seltenen Fällen eine latente HIV-Infektion zeigen (Chun et al. 1998). Latent infizierte Zellen können jederzeit wieder aktiviert werden und HIV-Partikel produzieren, was zu einer erneuten produktiven HIV-Infektion führen kann (Dahl et al. 2010). Die persistent infizierten Zellpopulationen werden auch Virusreservoirs genannt, weil sie auch bei Unterdrückung der HIV-

Replikation durch antiretrovirale Therapie dazu führen, dass das Virus nicht aus den HIV-infizierten Personen eliminiert werden kann. Publierte Beispiele für solche Virusreservoirs sind ruhende CD4+ T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, wie auch B-Zellen (Blankson et al. 2002) und Gehirnzellen wie z.B. Astrozyten und neurale Progenitorzellen (Kramer-Hämmerle et al. 2005, Churchill and Nath 2013, Nath 2014, Schneider et al. 2014).

Latent-infizierte Zellen enthalten dauerhaft funktionelle HIV-Proviren, die entweder in unintegrierter oder integrierter Form vorliegen (Lassen et al. 2004, Van Lint et al. 2013). Für die Entwicklung von Virusreservoirs kommen jedoch nur Zellen in Frage, bei denen das HIV-Provirus integriert ist, da in Zellen in denen das HIV-Provirus nicht integriert, das virale Genom wieder abgebaut wird und schließlich keine Infektion mehr aufweist (Dahl et al. 2010).

In Reservoirs mit integrierten Proviren kann die Virusexpression auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene unterdrückt werden. Möglichkeiten für eine Inhibition auf transkriptioneller Ebene können z.B. der Ort der Integration des viralen Genoms ins Wirtszellgenom sein, der Zustand der Chromatinstruktur an der Integrationsstelle, die Abwesenheit von wichtigen Transkriptionsfaktoren oder auch eine verminderte Tat-Aktivität (Dahl et al. 2010, Dahabieh et al. 2015). Die Risp/ Fam21 Proteine stellen einen zellulären Inhibitor der HIV-Replikation auf post-transkriptioneller Ebene dar (1.3.1.3)(Kramer-Hämmerle et al. 2005, Vincendeau et al. 2010).

1.3.1.2 Zelluläre Inhibitoren der HIV Replikation

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an zellulären HIV-Inhibitoren gefunden und analysiert. Dazu gehören die vielseitig beschriebenen Restriktionsfaktoren (Abbildung 5). Bei den Restriktionsfaktoren handelt es sich um Faktoren die durch vier Eigenschaften charakterisiert werden: sie müssen einen signifikanten Einfluss auf die HIV-Replikation ausüben, HIV hat Abwehrmechanismen gegen diese Restriktionsfaktoren entwickelt, durch die schnelle Mutationsrate von HIV zeigen auch die Restriktionsfaktoren Spuren von schneller Evolution und schließlich ist die Expression eines jeden Restriktionsfaktors direkt verbunden mit der angeborenen Immunantwort (Harris et al. 2012).

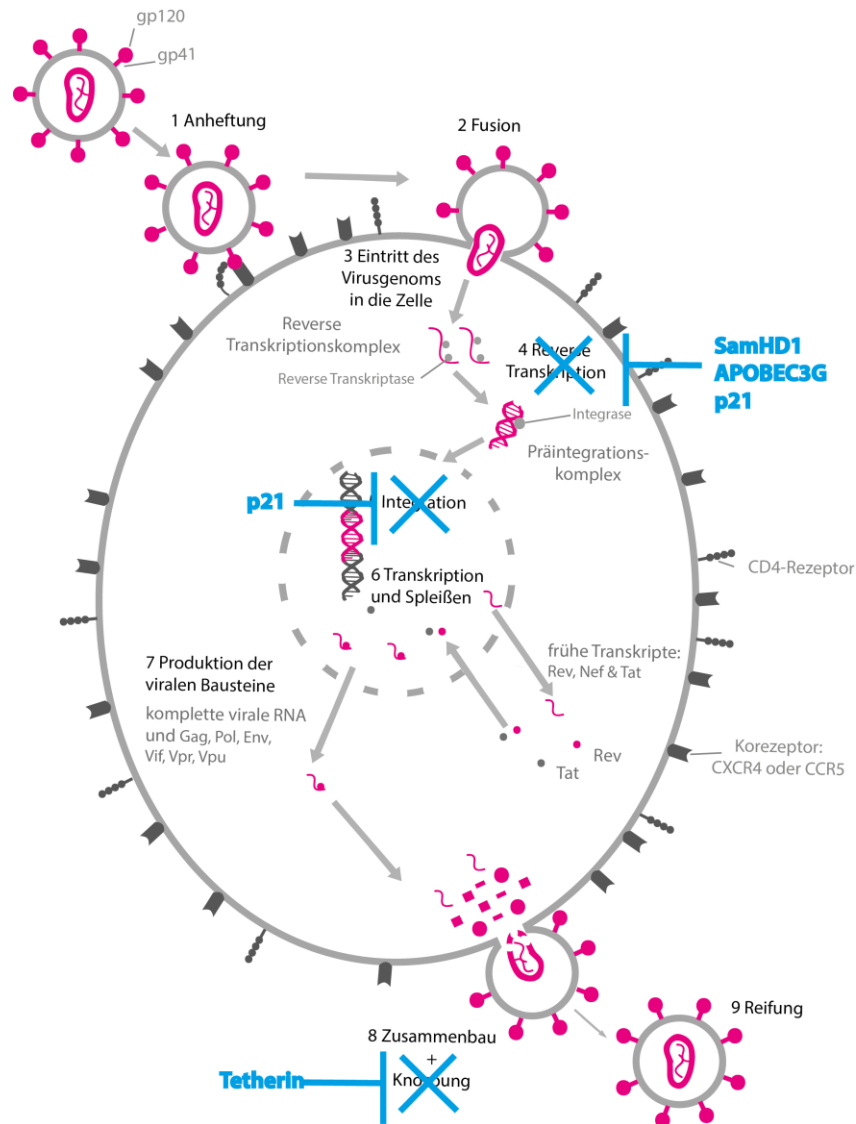


Abbildung 5: Übersicht über die beschriebenen zellulären HIV-Restriktionsfaktoren und den Schritt im Replikationszyklus der durch diese inhibiert wird. SamHD1, APOBEC3G und p21 können die reverse Transkription inhibieren: SamHD1 führt zum Abbau der für die reverse Transkription nötigen Triphosphatnukleotide, APOBEC3G wird von den Viren aus den produzierenden Zellen mitgebracht und führt zu einer G-zu-A-Hypermuation des DNA-RNA-Intermediats und p21 kann in Makrophagen die reverse Transkription stark in ihrer Effizienz hemmen, da es die Cyclin-abhängigen Kinasen inhibiert. In anderen Zellen, wie z.B. hämatopoetischen Stammzellen kann p21 auch die Integration von HIV hemmen. Tetherin verhindert die Abknospung der frisch gebildeten Viruspartikel.

Neben dem oben beschriebenen Restriktionsfaktor SamHD1 gibt es z.B. auch noch p21^{Cip1/Wif1} (p21), APOBEC3G und Tetherin. Bei p21 handelt es sich um einen potenten Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen, die für die effiziente Replikation von HIV-1 und anderen Viren nötig sind. In hämatopoetischen Stammzellen kann p21 selektiv die HIV-Integration hemmen und in Makrophagen die Effizienz von reverser Transkription als auch Integration reduzieren. P21 kann also verschiedene

frühe Schritte im HIV-Replikationszyklus inhibieren und die genaue Funktion ist abhängig vom infizierten Zelltyp (Buzon et al. 2011, Chen et al. 2011, Sáez-Cirión et al. 2011). APOBEC3G ist eine Cytidineaminase die G-zu-A-Mutationen im Positivstrang des vorübergehenden Einzelstrang-DNA Replikationsintermediates führt. Dazu wird APOBEC3G in den virusproduzierenden Zellen mit in die Viren verpackt, um dann in den Zielzellen durch die Cytidineaminaseaktivität zu einer Inhibition der reversen Transkription zu führen. Zusätzlich führt APOBEC3G auch noch dazu, dass die Translokation der reversen Transkriptase auf der viralen RNA gestört wird, was noch zusätzlich zu einer Verringerung der viralen cDNA Mengen führt (Ulenga et al. 2008, Amoêdo et al. 2011, Malim and Bieniasz 2012). Tetherin führt zu einem Zurückhalten der frisch gebildeten, viralen Partikel auf der Zelloberfläche der Wirtszellen und schließlich zur Endozytose und der damit einhergehenden Akkumulation in Endosomen. Bei Tetherin handelt es sich um ein zelluläres Oberflächenprotein, welches durch zwei Transmembrandomänen in der Zelloberfläche verankert ist. Beim Knospen der Viren von der Zelloberfläche bleibt eine dieser Domänen in den Viruspartikeln und eine in der Zellmembran verankert bzw. in einem anderen Viruspartikel, was dazu führt, dass die Viruspartikel an die Zelloberfläche oder an andere Viren gebunden sind (Homann et al. 2011, Malim and Bieniasz 2012).

Gegen die hier beschriebenen zellulären Restriktionsfaktoren hat HIV jedoch Abwehrmechanismen entwickelt. Zum Beispiel kann das HIV-1 Vif Protein verhindern, dass APOBEC3G in die Viruspartikel verpackt und stattdessen proteasomal abgebaut wird. Somit kann dann APOBEC3G in den Zielzellen nicht zu einer Hemmung der Reversen Transkriptase führen (Sheehy et al. 2002). Das HIV-2 Vpx Protein kann einen Abbau von SamHD1 vermitteln. HIV-1 Vpu hat eine infektionsverstärkende Wirkung, da es zu einer Reduzierung des Oberflächenproteins Tetherin führt, wodurch frisch gebildete Viren vollständig von der Zelloberfläche budden können (Malim and Bieniasz 2012). Bis auf Tetherin stellen diese Restriktionsfaktoren eine Inhibition der HIV-Infektion vor Integration der proviralen DNA in das Wirtszellgenom dar. Für eine Inhibition der HIV Replikation nach der Integration gibt es jedoch auch verschiedene Möglichkeiten: Inhibition der HIV Infektion auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene.

Auch bei der transkriptionellen Inhibition der HIV Infektion wird die Expression der viralen RNA durch zelleigene Mechanismen gehemmt. Dazu kann z.B. durch epigenetische Modifikationen eine Restriktion der HIV-Replikation ausgelöst werden. Zu diesen restriktiven, epigenetischen Modifikationen gehören Deacetylierung der Histone, Methylierung der Histone und Methylierung der DNA. Weitere Möglichkeiten zur transkriptionellen Replikationsinhibition bestehen in der

Beeinträchtigung des kotranskriptionellen Spleißvorgangs der Vorläufer-mRNA-Kopien durch exogene Spleißinhibierer (Karn and Stoltzfus 2012). Des Weiteren gibt es eine Vielzahl an zellulären Faktoren die die Transkription positiv aber auch negativ beeinflussen können (Mbonye and Karn 2014).

Ein Beispiel für einen Inhibitor der HIV-Infektion auf posttranskriptioneller-Ebene ist das Monozyten chemotaktisches Protein-induzierendes Protein 1 (MCP1P1). Dieses Protein ist eine Ribonuklease die selektiv an virale mRNAs bindet und somit zu deren Abbau führt (Liu et al. 2013). Ein weiteres Beispiel für posttranskriptionelle Inhibition stellen die Risp/ Fam21 Proteine dar, die im Folgenden genauer besprochen werden.

1.3.1.3 Risp/ Fam21 als zellulärer HIV-Inhibitor

Ein weiterer, möglicher, zellulärer Inhibitor der HIV-Infektion sind die als Rev-interagierende Proteine gefundenen Risp/ Fam21 Proteine. Diese Proteine sind Teil eines Komplexes, genannt WASH-Komplex, mit welchem sie eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts spielen (Gomez and Billadeau 2009). Risp/ Fam21 ist ein Teil des WASH-Komplexes, welcher ein nucleation-promoting-factor ist und Arp2/3 aktiviert (Seaman et al. 2013). WASH kann somit die Bildung von neuen Aktintubuli vorantreiben. Desweiteren befindet sich am C-Terminalen Ende von den Risp/ Fam21 Proteinen eine Bindestelle für das „Capping“ Protein, welches die Aktinpolymerisierung reguliert. Dieses Protein kann an Aktinfilamente binden und führt dabei zu einem Block der Aktinpolymerisierung und gleichermaßen zu einem Abbau der Aktinstränge (Edwards et al. 2014). Risp/ Fam21 bindet mit seinem C-terminalen Ende an den Retromer-Komplex und bringt so den WASH Komplex zu den Endosomen um den retrograden Transport von zu recycelnden Rezeptoren wie z.B. CIMPR, SorL1 oder DMT1 o.ä. von der Zelloberfläche zurück an die jeweiligen Empfängermembranen über das Zytoskelett zu ermöglichen (Harbour et al. 2012). Der Retromer-Komplex, an den Risp/ Fam21 über ein sogenanntes, sich wiederholendes LFa-Motiv im C-terminalen Ende von Risp/ Fam21 und das Retromer-Vps35 Protein bindet (Jia et al. 2012) ist wichtig, um die Rezeptoren, die von der Zelloberfläche kommen, zu sortieren. Der Cargo-Erkennungskomplex bestehend aus Vps35, Vps29 und Vps26 erkennt Cargo-Proteine und sorgt für einen Rücktransport von Proteinen, die wiederverwertet werden sollen, von den Endosomen zum Golgi-Apparat (Harbour et al. 2012, McGough et al. 2014).

Es ist bekannt, dass das Aktinzytoskelett eine grundsätzliche Rolle bei der HIV-Infektion spielt. Bisher konnte gezeigt werden, dass das Aktinskelett für die intrazelluläre Migration der HIV-Bestandteile rekrutiert wird. Zum Beispiel müssen der Reverse-Transkriptase- sowie der Präintegrationskomplex

innerhalb der Zelle bis zu Zellkern und die HIV-mRNAs aus dem Zellkern sowie auch die HIV-Proteine zu der Abkapselungsstelle transportiert werden. Für all diese Wege wird das zelluläre Aktinzytoskelett von HIV übernommen und sich zueigen gemacht (Kimura et al. 2000, Hofmann et al. 2001, Spear et al. 2013). Zusätzlich ist bei ruhenden CD4⁺ T-Zellen zu beobachten, dass sie eine dichte Matrix aus Aktin unter der Zellhülle besitzen, was den Eintritt des Virus in die Zelle erschwert (Spear et al. 2012, Pan et al. 2013). Somit spielt das Aktinzytoskelett eine ambivalente Rolle bei der HIV-Infektion. Es kann einerseits kontraproduktiv wirken und frühe Schritte der HIV Infektion erschweren. Auf der anderen Seite kann sich der Virus das Zytoskelett wie oben beschrieben auch zunutze machen.

Bei einem Yeast-two-hybrid Screen einer T-Zell cDNA-Bibliothek mit HIV-Rev wurde eine Sequenz mit dem Namen 16.4.1 gefunden (Kramer-Hämmerle et al. 2005). Diese Sequenz ist in den Proteinen der Risp/ Fam21-Familie enthalten. Diese Proteinfamilie wird von vier homologen Genen exprimiert, welche vermutlich durch Genduplikation entstanden sind: Fam21A, B, C und das trunkierte Fam21D. Von diesen vier Fam21-Genen werden mRNAs transkribiert, die dann auch noch unterschiedlich gespleißt werden können. Mit den verschiedenen Spleißvarianten konnten laut Ensembl (www.ensembl.org) und der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) insgesamt 15 verschiedene, bisher beschriebene mRNA-Sequenzen, die für funktionelle Fam21-Proteine kodieren, identifiziert werden.

Untersuchungen dieser komplexen Proteinfamilie in persistent HIV-infizierten Astrozyten (TH4-7-5) konnten zeigen, dass die Transfektion von siRNAs gegen die 16.4.1-Sequenz zu einem Anstieg der Rev-Aktivität und gleichzeitig auch zu einer erhöhten Virusproduktion führt. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression der 16.4.1-Sequenz oder eines volllänge Risp/ Fam21 Proteins zu einer verringerten Rev-Aktivität und zu einer verringerten Virusproduktion in diesen Zellen (Vincendeau et al. 2010). Die Risp/ Fam21 Proteinfamilie stellt den bisher einzigen Kandidaten zur zellulären, post-transkriptionellen HIV-Inhibition dar, was die Untersuchung dieses Inhibitors besonders interessant macht.

Allerdings ist noch nicht bekannt, ob diese von Risp/ Fam21 abgeleiteten Proteine auch in anderen Zellen die HIV-Replikation inhibieren könnten und somit für die Entwicklung von Hemmstoffen gegen HIV interessant sind. Bisherige Untersuchungen zur Expression der Risp/ Fam21 Proteine beschränken sich auf RNA-Expressionsanalysen von verschiedenen humanen Gewebetypen und es konnte Risp/ Fam21 Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (EMBL-EBI Uniprot-server: <http://www.ebi.ac.uk/gxa/genes/ENSG00000172661>). Jedoch ist über die Expression von Risp/ Fam21 RNA bzw. Proteinen in einzelnen Zelltypen noch nichts bekannt.

1.3.2 Hemmung der HIV-Replikation durch exogene, antivirale Wirkstoffe

1.3.2.1 Klinisch angewandte Wirkstoffe und Limitierungen gegenwärtiger anti-HIV Therapien

Es gibt momentan 25 antivirale Wirkstoffe, die für die Behandlung von HIV von der ‚U.S Food and Drug Administration‘ (FDA) zugelassen sind (<http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>; 11.04.2015). Sie werden eingeteilt in Gruppen entsprechend ihrer Hauptangriffspunkte im Replikationszyklus des Virus: nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren (NtRTIs), nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Protease-Inhibitoren (PIs), Eintritts-/Fusionsinhibitoren (FIs) und Integrase-Inhibitoren (De Clercq 2007, Adamson and Freed 2010) (Abbildung 6; Tabelle 1)

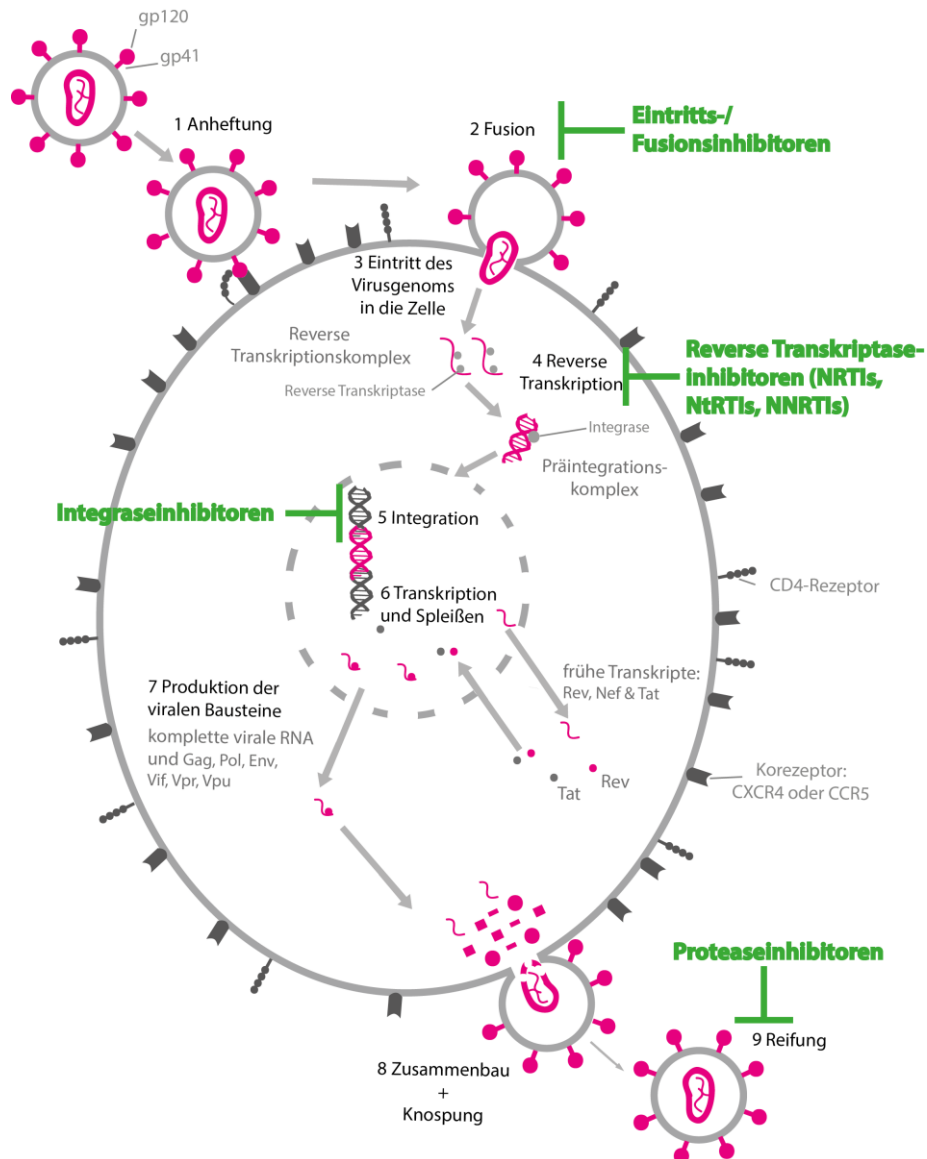


Abbildung 6: Schematische Übersicht über die Klassen der anti-HIV Wirkstoffe und die Schritte im HIV-Replikationsmechanismus die sie inhibieren. Die bisher identifizierten HIV-Inhibitoren werden in Klassen entsprechend ihres Hauptangriffspunktes im Replikationszyklus eingeteilt: Eintritts-/Fusionsinhibitoren, Reverse Transkriptaseinhibitoren, Integraseinhibitoren und Proteaseinhibitoren. NRTIs = nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren, NtRTIs = nukleotidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren, NNRTIs = nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren.

Tabelle 1: HIV-Inhibitorklassen und einige Beispiele. Quelle: <http://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>; 11.04.2015

Inhibitorklasse	Anzahl an FDA-zugelassenen Wirkstoffen in dieser Klasse	Beispiele
Eintritts-/ Fusionsinhibitoren	2	T-20
Nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	7	AZT
Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase-Inhibitoren	5	Efavirenz
Integrase-Inhibitoren	3	Raltegravir
Protease-Inhibitor	8	Darunavir

Durch eine Kombination von mehreren dieser Wirkstoffen in der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) werden gezielte Schritte im Replikationszyklus des HI-Virus angegriffen, wodurch die Virusausbreitung effektiver gehemmt wird, als mit einer Ein-Wirkstoff Therapie (Shafer and Vuitton 1999). Jedoch hat auch HAART mehrere Limitierungen. Die gravierendste Limitierung ist wohl, dass HAART nur virostatistische Effekte hat, d.h. dass HAART die Virusproduktion im Patienten stark reduziert (oft unter der Nachweisgrenze), aber nicht vollständig beseitigt. Der Patient bleibt lebenslang auf HAART angewiesen, da beim Absetzen der Therapie die Virusproduktion wieder dramatisch zunimmt (Blankson et al. 2002). Ausserdem kann HAART die Entstehung von resistenten Viren, trotz der Kombination von drei verschiedenen Wirkstoffen, nicht verhindern sondern nur verlangsamen (Clavel and Hance 2004, De Clercq 2007, Ammaranond and Sanguansittianan 2012). Ein weiteres Problem, das mit den für HAART verwendeten Wirkstoffen verbunden ist, sind verschiedene Nebenwirkungen, die durch die Langzeittherapie deutlich die Gesundheit der Patienten beeinträchtigen können (Souza et al. 2013, Torres and Lewis 2014).

Auf die hohen Kosten von HAART, und die damit verbundene beschränkte globale Verfügbarkeit von Medikamenten wurden bereits weiter oben eingegangen (1.1).

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich wird, gibt es einige Schritte im HIV-Replikationszyklus, gegen die es bisher noch keine zugelassenen Medikamente gibt, wie z.B. die Anheftung der Viren an die Zelle, die virale Transkription, alle posttranskriptionellen Vorgänge, die für die Produktion der viralen Proteine

und den Zusammenbau der Viruspartikel erforderlich sind. Diese Schritte bieten noch interessante Ziele für die andauernde Suche nach neuen HIV-Inhibitoren.

Zur Identifizierung von neuen HIV-Inhibitoren werden Screening-Verfahren angewendet, die es erlauben, schnell und ohne großen Zeitaufwand viele Substanzen gleichzeitig zu testen. Dazu zählt z.B. das in dieser Arbeit verwendete EASY-HIT System das auf LC5-RIC Zellen beruht (Kremb et al. 2010). Diese Zellen beinhalten ein *DsRed1* Reportergen, das für ein rot fluoreszierendes Protein kodiert. Das Reportergen enthält den HIV-1 Promoter, der durch HIV-1 Tat aktiviert wird, sowie Elemente für die Rev-abhängige Expression der HIV RNA. Somit wird das Fluoreszenzprotein nur in Anwesenheit von HIV-Tat und –Rev exprimiert. Dadurch lässt sich die Infektion mit HIV optisch darstellen und messen.

Mit diesem System können wir potentielle HIV-Inhibitoren testen und mit Hilfe von zusätzlichen Assays wie z.B. dem Time-of-addition Assay (Kremb et al. 2010, Daelemans et al. 2011) oder einem Attachment Assay, den Wirkmechanismus eingrenzen.

1.3.2.2 Naturstoffe zur Inhibition von HIV

Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Medikamente dienen schon seit Tausenden von Jahren als z.T. sehr effektive Medikamente. Einige der wohl bekanntesten Medikamente, die auf Naturstoffen beruhen sind Aspirin, Penicillin und Morphinum (Butler 2004). Auch einige Vertreter der Antiviralen Wirkstoffe gegen HIV stammen aus dem Bereich der Naturstoffe, wie z.B. der zugelassene HIV Inhibitor Azidothymidin (AZT) (Yan 2004) oder auch Griffithsin (Mori et al. 2005), ein Inhibitor der sich noch in der Entwicklungsphase befindet.

Die große Biodiversität der terrestrischen und marinen Lebewesen stellt einen großen Pool an neuen, potentiellen Medikamenten gegen viele Krankheiten dar, sie muss nur noch weiter erforscht werden, um die potentiellen Naturstoffe mit der gewünschten Aktivität zu finden. Zwischen 1990 und 2000 gab es einen Boom in der Erforschung von Naturstoffen aufgrund der Entwicklung von High-Throughput Screening- und neuen Isolierungsmethoden, der jedoch von seitens der pharmazeutischen Industrie wieder abgeflaut ist (David et al. 2014).

Eine Kriterium für die Auswahl von Naturstoffen für Tests auf Aktivität ist ihr Einsatz in der traditionellen Medizin (David et al. 2014). Es werden also die ursprünglichen Anwendungsmethoden wie Tinkturen oder Tees in der Forschung verwendet, um Effektivität und Toxizität zu testen. Dabei handelt es sich also häufig um Extrakte mit einer Vielzahl an Inhaltsstoffen die dann möglicherweise auch mehrere Wirkmechanismen aufweisen (Gertsch 2011). Generell tendiert die pharmazeutische

Industrie, unter anderem auch getrieben von regulatorischen Kontrollorganen der Arzneimittelzulassung und patentrechtlichen Fragestellungen, Wirkstoffe gegen ein einziges, genau definiertes Angriffsziel zu entwickeln, da in Stoffgemischen Ingredienzien enthalten sein könnten, die negative Auswirkungen auf Zellen, den Körper oder auch einfach auf die aktive Substanz selbst zeigen könnten (Huxtable 1992, Joshi and Kaul 2001). Dem gegenüber steht jedoch die Möglichkeit, dass dies nicht der Fall ist und dass in Extrakten durch die Vielzahl an aktiven Inhaltsstoffen auch synergistische Effekte gegen die jeweilige Krankheit entstehen können. Diese synergistischen Effekte könnten zum Beispiel zu einer Reduzierung der Medikamentendosen führen, um somit Nebenwirkungen zu minimieren (Gertsch 2011, David et al. 2014). Bei der Verabreichung eines größeren Stoffgemisches wie das bei einem Extrakt der Fall ist, wäre es also auch denkbar, dass eine Verhinderung der Resistenzbildung möglich wäre.

Aufgrund ihrer meist guten Bioverfügbarkeit würden sich Naturstoffe sehr gut eignen, auch den betroffenen Menschen der Dritten Welt eine günstige Alternative zu den teuren antiviralen Medikamenten zu ermöglichen, denn wie bereits erwähnt, wäre gerade in diesen Gebieten mit der höchsten Prävalenz an HIV eine günstige Alternative zu der teuren HAART-Behandlung von hoher Bedeutung.

Polyphenole sind sekundäre Pflanzenmetabolite die in höheren Pflanzen gebildet werden und ein breites Spektrum an biologischen Effekten aufweisen: antitumorigen, antimikrobiell, antiinflammatorisch und antiviral (Urquiaga and Leighton 2000, Cos et al. 2003, Arts and Hollman 2005, Halliwell et al. 2005, Pan et al. 2010, Helfer et al. 2014). Des Weiteren zeigen Polyphenole möglicherweise auch Aktivität gegen Mikroorganismen mit Resistenzen gegen multiple Medikamente (Cushnie and Lamb 2005, Daglia 2012). Wie in dem Review von Kerstin Andrae-Marobela (Andrae-Marobela et al. 2013) zusammengestellt wurde, konnte Polyphenolen auch starke anti-HIV Aktivität nachgewiesen werden. Durch polyphenolische Bestandteile können fast alle Schritte im HIV-Replikationszyklus inhibiert werden: Eintritt in die Zelle, reverse Transkription, Integration und auch die Reifung der Viruspartikel nach dem Knospen. So kann z.B. Epigallocatechingallat, ein Polyphenol welches in großen Mengen in grünem Tee vorkommt, bei den unterschiedlichsten Dosen auch unterschiedliche Schritte im HIV-Replikationszyklus hemmen (Yamaguchi et al. 2002). Polyphenole stellen also eine interessante Stoffgruppe für die Suche nach neuen HIV-Inhibitoren dar. Wir selbst haben auch schon Untersuchungen bezüglich der anti-HIV Aktivität von einem polyphenolreichen Extrakt der Pflanze *Pelargonium sidoides* durchgeführt, bei

dem die starke anti-HIV Aktivität der Polyphenole dieser Pflanze auf den Eintritt des Virus in die Zelle festgestellt werden konnte (Helfer et al. 2014).

Cistus incanus (Ci) oder, zu Deutsch die graubehaarte Zistrose, gehört in die Familie der Zistrosengewächse (Cistaceae) und ist in weiten Teilen des europäischen Mittelmeerraumes zu finden (Comandini et al. 2006). Pflanzen dieser Familie werden schon seit mehreren hundert Jahren in der Naturmedizin eingesetzt zur Behandlung von unterschiedlichen Hautkrankheiten und Entzündungsreaktionen (Petereit et al. 1991, Droebner et al. 2007). Außerdem wird Extrakten von Ci antiinflammatorische, antibakterielle und antifungale Wirkung zugeschrieben (Kalus et al. 2010). Ein Sud aus Ci kann unter dem Namen Cystus052® (Dr. Pandalis Urheimische Medizin) erworben werden. Ci ist als eine stark polyphenolhaltige Pflanze bekannt, was durch diverse Untersuchungen bestätigt wurde (Petereit et al. 1991, Droebner et al. 2007). Des Weiteren wurde für Extrakte aus Ci auch eine inhibierende Wirkung gegen Influenza sowohl in Zellkultur, als auch in Mäusen gezeigt (Droebner et al. 2007, Ehrhardt et al. 2007).

1.3.2.3 HIV-Zelleintritt als Ziel der Inhibitorforschung

Der Haupteintrittsweg von HI-Viren in die Zielzellen ist über Bindung der viralen Oberflächenproteine an zelluläre Rezeptoren und anschließende Fusion der viralen mit der zellulären Lipidmembran (Freed 2001, Wilen et al. 2012). Da ohne den Eintritt des Virus in Zielzellen keine Infektion stattfinden kann, ist dieser Schritt ein Schlüsselpunkt in der HIV-Replikation. Deswegen ist gerade die Suche nach Inhibitoren für diesen Schritt ein aktuelles Thema in der Wirkstoffforschung (Briz et al. 2006, Leonard and Roy 2006, Esté and Telenti 2007, Adamson and Freed 2008, Haqqani and Tilton 2013). Am Eintritt des HI-Virus in Zellen ist eine Vielzahl von viralen sowie zellulären Faktoren beteiligt: die Ladung der viralen und zellulären Hüllen, die verschiedenen zellulären Rezeptoren, die einen ersten Kontakt mit dem Virus aufnehmen, die viralen Oberflächenproteine gp120 und gp41 und die zellulären Oberflächenproteine CD4 und CXCR4 oder CCR5 (Freed 2001). Jedes dieser Proteine bietet einen Angriffspunkt für Inhibitoren. Zwei bereits zugelassene Medikamente die den Eintritt des Virus in die Zelle verhindern sind T-20 und Maraviroc, wobei T-20 ein Fusionsinhibitor ist, der die Konformationsänderung von gp41 verhindert und Maraviroc ein Inhibitor des CCR5-Korezeptors (Qian et al. 2009). Jedoch ist bislang noch eine Vielzahl an Angriffspunkten für neue HIV-Inhibitoren unerforscht und bietet Möglichkeiten für die Entdeckung neuer Wirkstoffe.

1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Aufgrund der Limitierungen der bisherigen klinisch verfügbaren anti-HIV Therapien (1.3.2.1), hängt die erfolgreiche Bekämpfung der HIV-Epidemie von der fortlaufenden Entwicklung von neuen anti-HIV Strategien ab. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, zwei neue Ansätze zur Inhibition der HIV Replikation in Bezug auf ihr Potential für die Entwicklung von neuen antiviralen Strategien zu evaluieren.

Der erste Ansatz beschäftigt sich mit dem antiviralen Potential von zelleigenen HIV-Inhibitoren. Als Beispiel diene die Risp/Fam21 Proteinfamilie, die in persistent infizierten Astrozyten die HIV Replikation hemmt (Vincendeau et al. 2010). In dieser Arbeit soll die Expression der Risp/Fam21 Familie in verschiedenen humanen Zelltypen, insbesondere HIV-Zielzellen, untersucht werden. Zusätzlich soll ein System zur Modulierung der Risp/Fam21 Expression etabliert werden und mit diesem soll die Hemmkapazität der Risp/Fam21 Proteine in anderen HIV-1 Zielzellen wie z.B. T-Zellen untersucht werden.

In einem zweiten Ansatz soll untersucht werden, ob Heilpflanzen mit bekannter antiviraler Aktivität eine mögliche Quelle für neue HIV-Inhibitoren sein könnten. Als Beispiel dient die Heilpflanze *Cistus incanus* (Ci), die bekanntermaßen die Vermehrung des Influenzavirus hemmt (Droebner et al. 2007, Ehrhardt et al. 2007). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Ci Extrakte die HIV Replikation inhibieren. Lässt sich eine anti-HIV Aktivität nachweisen, sollen weitere Untersuchungen zur Ermittlung der Bandbreite der anti-HIV Aktivität gegen verschiedene Virus-Typen sowie zum Hemmmechanismus durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Materialien wie Zellkulturmedien, Chemikalien, Puffer, Kits, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software, Antikörper und Primer sind in Anhang 1 aufgeführt.

2.1.1 HIV-Inhibitoren

Tabelle 2:Pflanzenmaterial

Name	Hersteller
Cystus® Bio Teekraut	Dr. Pandalis Urheimische Medizin
Cystus052® Sud Naturtrüb	Dr. Pandalis Urheimische Medizin
<i>Cystus incanus</i> lebende Pflanzen	Rühlemann's Kräuter & Duftpflanzen; www.kraeuter-und-duftpflanzen.de

Tabelle 3:HIV-Referenzinhibitoren

Name	Hersteller/ Lieferant
Azidothymidin (AZT)	NIH AIDS Reagent Program
Enfuvirtide (T-20)	NIH AIDS Reagent Program

2.1.2 Plasmide

Verwendete Plasmide

pLAI.2

Plasmid mit der proviralen DNA des T-Zell-tropen HIV-1 Virusisolats Lai.2 zur Herstellung von Viren (2.2.1.5) in HEK293T Zellen (Peden et al. 1991) (NIH Lot Nummer 3050749).

pNL(AD8)

Für die Herstellung dieses Plasmids wurde ein 1,7 kbp langes Fragment in der für gp120 codierenden Region des X4-tropen pNL4-3 mit der entsprechenden Region des Klons pAD8-1 ersetzt. Mit diesem

Plasmid kann replikationskompetentes, R5-tropes Virus produziert werden (Freed et al. 1995) (NIH Lot Nummer: 3070021).

pBR-NL43-Gag-iGFP

pBR322 Vektor, der das HIV-1_{NL4-3} provirale Genom enthält, bei dem in der *gag*-Sequenz ein GFP eingebaut wurde (Koppensteiner et al. 2012).

pLVTHM

Hierbei handelt es sich um ein Expressionsplasmid der zweiten Generation mit dem GFP (oder ein anderes Zielgen) und/ oder eine shRNA exprimiert werden kann. GFP steht unter der Kontrolle eines EF1-alpha Promoters, die shRNA unter der Kontrolle eines H1-Promoters. Das Plasmid war ein Geschenk von Didier Trono (Addgene Plasmid #12247).

pSPAX2

Dies ist ein Verpackungsplasmid der zweiten Generation. Es enthält die Sequenzen für die HIV Strukturproteine, Enzyme und Rev und Tat, damit lentivirale Partikel hergestellt werden können. Das Plasmid war ein Geschenk von Didier Trono (Addgene Plasmid #12260).

pMD2.G

Expressionsplasmid für die Oberflächenproteine des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) zur Herstellung von Pseudotyp HIV-1 Viren oder lentiviralen Vektoren, die das VSVG-Protein in der Hülle tragen. Das Plasmid war ein Geschenk von Didier Trono (Addgene Plasmid #12259).

Während dieser Arbeit von mir generierte Plasmide

pLVTHM-GFP-n.s.

Bei diesem Plasmid wurde in das Plasmid pLVTHM an die Stelle für die shRNA-Expressionskassette die Sequenz für eine non-silencing shRNA eingefügt (Tabelle 24).

pLVTHM-GFP-shFam21

In diesem Fall wurde in das Plasmid pLVTHM an die Stelle für die shRNA Expressionskassette die Sequenz für eine shRNA gegen Risp/ Fam21 Proteine eingefügt (Tabelle 24).

pLVTHM-16.4.1-GFP

Hier wurde in das pLVTHM-Plasmid anstelle der *gfp*-Sequenz die Sequenz für ein 16.4.1-GFP Fusionsprotein eingebracht.

pLVTHM-16.4.1-GFP-n.s.

In diesem Plasmid wurde wieder die *gfp*-Sequenz durch die Sequenz für ein 16.4.1-GFP Fusionsprotein ersetzt und zusätzlich wurde auch die non-silencing shRNA hinter dem H1-Promoter eingebaut.

pLVTHM-16.4.1-GFP-shFam21

Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein pLVTHM-Plasmid bei dem die *gfp*-Sequenz durch die Sequenz für ein 16.4.1-GFP Fusionsprotein ersetzt wurde und gleichzeitig die shRNA für einen Knockdown der Risp/ Fam21 Proteine eingesetzt wurde.

2.1.3 Prokaryotische Zellen

XL-10 Gold

Diese chemisch kompetenten E. coli Zellen des XL-10 Gold-Stammes werden zur Transformation oder Re-transformation von Plasmiden verwendet (Agilent).

2.1.4 Humane Zellen

U138MG

Humane Glioblastoma Zelllinie. Diese Zelllinie stammt von einem astrozytärem Tumor ab. (ATCC[®] HTB-16TM)

85HG66

Humane Astrozyten Zelllinie, welche von einem Gehirntumor abstammt (Stavrou et al. 1987).

TH4-7-5

Bei diesen Zellen handelt es sich um einen persistent mit HIV-1_{IIIB} infizierten Subklon der 85HG66 Zellen (Brack-Werner et al. 1992).

Thpl

Hierbei handelt es sich um eine Monozytenzelllinie, da diese Zellen von einer akuten monozytären Leukämie abstammen. (ATCC®TIB-202™)

Jurkat

Jurkat Zellen sind T-Zellen, die von einer akuten lymphoblastischen Leukämie abstammen und in Suspension wachsen. (DSZM ACC 282)

HEK293T

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane, embryonale Nierenzellen, die von der Zelllinie HEK293 abstammen, und mit dem T-large Antigen immortalisiert wurden. Die HEK293T-Zellen sind im Allgemeinen sehr gut transfizierbar und eignen sich um Retroviren herzustellen (ATCC® CRL-3216™).

LC5-CD4

HIV-infizierbare HeLa-Zelllinie, da das CD4-Oberflächenprotein eingebracht wurde, damit die Zellen dieses stabil exprimieren (Wachinger et al. 1998). Die Zellen exprimieren den Co-Rezeptor CXCR4 natürlicherweise.

LC5-RIC (Kremb et al. 2010)

Diese Zelllinie stammt von der parentalen Zelllinie LC5 (eine HeLa-Zelllinie) ab. Diese Zelllinie exprimiert natürlicherweise den HIV Co-Rezeptor CXCR4. Zur Expression des Oberflächenrezeptors CD4 wurden die Zellen mit einem Gen transduziert (LC5-CD4), das die Expression des CD4 Oberflächenrezeptors und eine Geneticin-Resistenz vermittelt (Wachinger et al. 1998). Des Weiteren wurden die Zellen stabil mit dem pLRED(2xINS)R Reporterkonstrukt transfiziert, welches sowohl eine Hygromycin B Resistenz enthält als auch das unter der HIV-LTR Kontrolle stehende Fluoreszenzprotein *DsRed1* (Kremb et al. 2010). Das Fluoreszenzprotein wird durch die transkriptionsregulierende Aktivität des HIV Proteins Tat und durch die post-transkriptionelle Aktivität des HIV-Proteins Rev aktiviert und reguliert.

LC5-RIC-R5 (Kremb et al. 2010)

Bei den LC5-RIC-R5 Zellen handelt es sich um LC5-RIC Zellen, die zusätzlich noch ein Konstrukt enthalten zur stabilen Expression des Oberflächenrezeptors CCR5 (Jones et al. 2007). Dadurch ist es

möglich, auch R5-trope Virusstämme für Versuche einzusetzen, welche CCR5 als Corezeptor für den Zelleintritt verwenden.

PBMC

Periphere mononukleäre Zellen des Blutes. Diese Zellen werden aus Buffy-Coats (bayrisches Rotes Kreuz) frisch isoliert, für drei Tage mit 20 U/ml hIL-2 und 1 µg/ml PHA stimuliert und dann für Infektionsversuche verwendet.

MDM

Monocyte-derived macrophages (MDM) oder auf Deutsch: Makrophagen die aus Monozyten differenziert werden, sind, wie der Name schon sagt, Monozyten die wie auch die restlichen PBMCs aus Buffy-Coats isoliert werden um dann schließlich in einem bestimmten Medium (Tabelle 12) für sieben Tage zu Makrophagen differenziert zu werden.

2.1.5 Infektiöse Virusüberstände

2.1.5.1 HIV-Laborstämme

Name	Beschreibung
HIV-1 _{LAI}	CXCR4-tropes HIV-1 (Peden et al. 1991)
HIV-1 _{AD8}	CCR5-tropes HIV-1 (Freed et al. 1995)
HIV-1 _{NL4-3-Gag-iGFP}	CXCR4-tropes HIV-1 mit GFP in Gag (Koppensteiner et al. 2012)

2.1.5.2 Patienten-HIV-isolate

Name	Beschreibung
HIV-1 _{M_{MVP899-87}}	HIV-1 aus der Gruppe M, isoliert in 1987 in Deutschland (Gürtler et al. 1994)
HIV-1 _{O_{MVP5180-91}}	HIV-1 aus der Gruppe O, isoliert in 1991 in Kamerun (Gürtler et al. 1994)
HIV-2 _{MVP10668-93}	HIV-2, isoliert in 1993
HIV-1 _{V13-03413B}	Multiresistentes HIV-1, isoliert in Deutschland

Die HIV-Patientenisolate wurden von Prof. Dr. Lutz Gürtler (Max-von-Pettenkofer Institut) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Aussaat humaner Zellen

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in Nunc Solo Flask Zellkulturflaschen verschiedener Größen (25 cm², 75 cm² und 185 cm²) im Begasungs-Brutschrank in den jeweiligen Kulturmedien (Tabelle 12). Visuelle Kontrolle der Zellen auf den Grad der Konfluenz fand alle drei bis vier Tage statt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten, wurden sie gesplittet. Dazu wurden folgende Schritte der Reihe nach durchgeführt: Medium abnehmen, zweimal mit PBS waschen, Ablösen der Zellen mit Trypsin/ EDTA. Durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen konnten in den jeweiligen Verdünnungen (1:2 bis 1:20), je nach Zeitplan der weiteren Versuche die mit diesen Zellen durchgeführt werden sollten, wieder in der Zellkulturflasche ausgesät werden.

Zur Selektion auf LC5-RIC Zellen, die den CD4-Oberflächenrezeptor überexprimieren und z.T. das Reporterkonstrukt pLRED(2xINS)R enthielten, wurde das Medium für die LC5-CD4, LC5-RIC und LC5-RIC-R5 Zelllinien mit Geneticin (750 µg/ml) für den CD4-Oberflächenrezeptor und Hygromycin B (1 µg/ml; nur LC5-RIC und LC5-RIC-R5) für das Reporterkonstrukt versetzt.

Für die Durchführung der Versuche mussten die Zellen in verschiedenen Konzentrationen in Zellkulturplatten ausgesät werden, die in verschiedenen Formaten (6-, 12-, 24- oder 96-wells) vorlagen. Dazu wurden die Zellen geerntet und nach der Wiederaufnahme in das Medium in einer Zählkammer ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellkonzentration wurden drei Großquadrate ausgezählt, der Mittelwert daraus berechnet und mit 10⁴ multipliziert, wodurch man die Zellzahl pro ml erhält. Die Zellen wurden standardmässig in Konzentrationen zu 1*10⁵ Zellen pro ml ausgesät, wobei in 96-well Vertiefungen 100 µl Zellsuspension und in 6-well Vertiefungen 2 ml Zellsuspension eingesät wurden.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren humaner Zellen

Für eine längerfristige Lagerung humaner Zellen können diese in Einfriermedium (Tabelle 12) in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die jeweiligen Zellen wurden geerntet, gezählt und anschließend für 5 Minuten bei 200 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in entsprechender Menge Einfriermedium aufgenommen, um eine Zellkonzentration von 1x10⁷ Zellen pro ml zu erhalten. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde dann in ein Nunc Cryo

Tube™ Vial überführt und sofort bei -80°C gelagert, da DMSO toxisch auf die Zellen wirkt. Am nächsten Tag konnten die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem Stickstofftank geholt und im Brutschrank bei 37°C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurden in 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums überführt und bei 200 xg für 5 Minuten abzentrifugiert. Der DMSO-enhaltende Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2.1.3 Isolierung von mononukleären Zellen aus „Buffy-coats“

Humane periphere mononukleäre Zellen wurden über Ficoll-gradienten Zentrifugation isoliert. Dazu wurden „Buffy-coats“ (jeweils ca. 25 ml Blut; mit CPD-Koagulanzen) vom Blutspendendienst des bayrischen Roten Kreuzes erhalten und mit dreifachem Volumen an PBS aufgefüllt. Bei den „Buffy-coats“ handelt es sich um grob vorgereinigte Leukozytenkonzentrationen. Das Blutplasma und ein Großteil der Erythrozyten wurde bei einem ersten Zentrifugationsschritt bereits entfernt. Das Blut-PBS-Gemisch wurde dann in 50 ml Falcons über jeweils 15 ml Ficoll geschichtet. Pro Falcon wurden 25 ml des Gemisches abgefüllt und schließlich bei 900 xg für 20 Minuten zentrifugiert. Der weiße Lymphozyten-/Monozytenring, der bei der Gradientenzentrifugation entstanden ist, wurde vorsichtig abgenommen und aus allen Falcons vereinigt. Die Lymphozyten-/ Monozyten wurden auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 500 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 2 ml ACK-Lysepuffer versetzt, damit die restlichen Erythrozyten lysiert werden. Nach einer Inkubation von zwei Minuten bei Raumtemperatur wurden die Falcons wieder auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (300 xg, 10 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in ca. 60 ml VLE-RPMI mit 10% FKS und 1% Anti/ Anti aufgenommen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in neues Medium mit 20 U/ml hIL-2 und 1 µg/ml PHA überführt und für drei Tage bei 37°C/ 5% CO₂ stimuliert für die Infektion mit HIV.

Für die Isolation der Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (MDMs) wurden die PBMCs sofort nach der Isolation in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Makrophagen-differenzierungsmedium (Tabelle 12) in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach dem Anheften der Monozyten an die Zellkulturschale (ca. vier Tage), wurden die freien Zellen gewaschen und die Monozyten noch für drei Tage mit dem Makrophagendifferenzierungsmedium zu Makrophagen differenziert.

2.2.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Xtreme Gene™

Transfektion ist eine Methode, um Fremd-DNA in eukaryotische Zellen einzubringen, mit dem Ziel, fremde Gene in den Zellen zu exprimieren. Xtreme Gene™ ist ein Multikomponenten-Reagenz der Firma Roche, das DNA nicht-liposomal komplexiert und in eukaryotische Zellen transportiert. Es wurde in dieser Arbeit für die Transfektion von Zellen mit Plasmiden eingesetzt.

Am Vortag der Transfektion wurden Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml in die Vertiefungen einer 6-well Platte ausgesät. Für die Transfektion eines Wells im 6-well-Platten-Format wurde der Transfektionsansatz wie folgend vorbereitet: 200 µl FKS-freies Medium und die gewünschten DNA-Mengen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, gemischt und 3 µl Xtreme Gene™ pro µg Plasmid zupipettiert und vorsichtig (anschnippen des Gefäßes) gemischt. Standardmässig wurde pro Plasmid 1 µg pro 6-well Platte eingesetzt. Dieser Ansatz inkubierte für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur und wurde anschließend vorsichtig auf die Zellen in den Vertiefungen der Platte getropft, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen.

Die Kultivierung der transfizierten Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) für 72 Stunden.

2.2.1.5 Produktion von HI-Viren aus Laborstämmen, Ernte, Lagerung und Vorbereitung für Versuche

Da für die meisten Versuche die Infektion der Zellen mit HIV-1 Viren nötig war, mussten diese hergestellt werden. Dabei wurde immer nach folgendem Schema vorgegangen:

HEK293T-Zellen wurden am Vortag in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml in 6-well Platten zu einem Endvolumen von 2 ml pro Well ausgesät. Somit konnte am folgenden Tag ein Transfektionsansatz (2.2.1.4) auf die Zellen pipettiert werden, der pro Ansatz jeweils 1 µg eines Plasmids mit proviraler DNA enthielt, wie z.B. pLAI, pNL(AD8).

Nach Inkubation bei Standardbedingungen für 48 Stunden wurde pro Well der 6-well Platte 1 ml Medium zugegeben, um ein Endvolumen von 3 ml pro Well zu erhalten und die Virenproduktion zu erhöhen. Nach weiteren 24 Stunden konnten die Viren dann geerntet werden, indem das Medium abgenommen und abzentrifugiert (5 Minuten bei 200 xg) wurde zur Entfernung der Zellreste. Dieser Überstand wurde dann in Nunc Cryo Tube™ Vials mit Außengewinde überführt und bei -80°C weggefroren.

Für Infektionsversuche wurde jeweils die bei -80°C eingefrorenen Viren für zwei Stunden im Brutschrank aufgetaut, damit sie noch nachreifen konnten und sich somit eine höhere Infektiosität der Viren ergab. Vor Durchführung von Infektionsexperimenten wurde eine Titration des infektiösen Zellkulturüberstandes auf LC5-RIC Zellen durchgeführt, und für die Infektion eine Menge Virus eingesetzt, die eine 100-fache Erhöhung der Signalintensität der Rotfluoreszenz über dem Hintergrund ergeben hatte. Dies entsprach für eine beispielhafte Viruspräparation des HIV-1_{LAI} etwa 1,7 ng p24 pro 6-well.

Zur Isolation von intakten Viruspartikeln mittels magnetischer Microbeads (2.2.1.15) wurden Viruspartikel produziert, die das CD44-Zelloberflächenprotein (Rezeptor für Hyaluronsäure) (Li et al. 2014) in der Lipidmembran tragen. HIV-1 infizierte CD44-positive Zellen können Viruspartikel mit CD44 in der Hülle produzieren (Lawn et al. 2000). Drei Tage nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand mit den CD44-positiven Viruspartikeln geerntet und konnte für Versuche verwendet werden.

2.2.1.6 Produktion von HI-Viren die aus Patienten isoliert wurden

Für die Verwendung von Patientenisolat-Viren wurden Kryotubes aufgetaut, die infizierte H9 Zellen und infektiösen Zellkulturüberstand enthielten. Diese Zellen wurden in VLE-RPMI-Medium in Kultur genommen und alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gezählt und ca. 1/3 der Zellen wurde durch frische H9-Zellen ersetzt. Gleichzeitig wurde auch die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen durchliefen ca. 6 Passagen bis im Zellkulturüberstand schließlich ausreichend infektiöse Viren vorhanden waren für Infektionsversuche. Die Virusproduktion wurde mittels Titration auf LC5-RIC Zellen überwacht. Für Infektionsversuche konnte direkt der frische Zellkulturüberstand als auch aufgetautes Virus eingesetzt werden. Das Einfrieren und Auftauen dieser Viren erfolgte genauso wie für Labor-HIV-Stämme beschrieben (2.2.1.5).

2.2.1.7 Produktion von lentiviralen Vektoren

Bei der Produktion von lentiviralen Vektoren wurden die Zellen in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml nicht wie bisher in 6-well Platten ausgesät, sondern in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den Konstrukten zur Produktion von lentiviralen Partikeln transfiziert (2.2.1.4). Dazu wurden folgende DNA-Mengen eingesetzt: 5 µg pLVTHM, 3,75 µg pSPAX2, 1,25 µg pMD2.G, 200 µl DMEM und 20 µl Xtreme-Gene. Die transfizierten Zellen wurden für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach den drei Tagen konnte schließlich der Überstand abgenommen und bei 300 xg für 5 Minuten abzentrifugiert werden. Im Anschluss wurde

der Zellkulturüberstand mit Hilfe von Amicon®-Säulchen (Merck Millipore) um das 10-fache aufkonzentriert und die p24-Menge über einen Gag-p24 ELISA bestimmt (2.2.1.8).

2.2.1.8 Bestimmung der Gag-p24 Menge mittels ELISA

Mit dem Gag-p24 ELISA Kit von Advanced Bioscience Laboratories ist es möglich die Mengen von Gag-p24 in Zellkulturüberständen zu messen. Diese wurden in DMEM/ 0,5% Triton-X 1:100 bis 1:100000, je nach der erwarteten Gag-p24 Menge in dem zu untersuchenden Zellkulturüberstand, verdünnt. Der 0,5% Triton-X Zusatz zu DMEM dient zur Lyse der Membranen der Viruspartikel, um die p24-Proteine zugänglich zu machen. Zeitgleich mit dem Ansetzen der Verdünnungsreihen wurde auch ein Standard pipettiert mit folgenden Gag-p24-Mengen: 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,125 pg/ml und 0 pg/ml. Von allen Ansätzen wurden schließlich 100 µl in die mit 25 µl Disruption-Puffer belegten Wells der ELISA-Platte pipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Wells mit dem Waschpuffer des Kits dreimal gewaschen und schließlich wurden 100 µl Konjugat-Lösung zugegeben. Die ELISA-Platte wurde wieder für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und im Anschluss wieder dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 100 µl Peroxidase-Substrat in die Wells gegeben und die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach den 30 Minuten wurde jeweils 100 µl der Stopp-Lösung in die Wells pipettiert und die Absorption in den Wells konnte bei 450 nm im Tecan-Reader gemessen werden. Bei der Auswertung konnte dann mit Hilfe des Standards eine Standardkurve erstellt werden, wodurch die Gag-p24 Mengen in den einzelnen Ansätzen bestimmt werden konnten.

2.2.1.9 Das EASY-HIT System (Krems et al. 2010)

Für die Analyse des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Infektiosität unterschiedlicher HIV-Stämme, wurden LC5-RIC bzw. LC5-RIC-R5 Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^4 pro 100 µl in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag mit Verdünnungsreihen der Substanzen versetzt. In 3-fach Ansätzen wurden die Zellen mit den Substanzen behandelt und je 20 µl der verschiedenen Virus-Verdünnungen wurde in die Ansätze pipettiert und für 48 Stunden inkubiert. Das Endvolumen in jedem Well betrug 120 µl.

Die Messung der Infektionsstärke der Zellkulturen erfolgte über Messung der DsRed1-Fluoreszenz (Schritt 1) (2.2.1.10). Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Test bestimmt (2.2.1.11). Des Weiteren wurde ein Virus Release Assay durchgeführt (Schritt 2), bei dem zum Zeitpunkt der DsRed1-Fluoreszenzmessung 20 µl des Überstandes auf am Vortag frisch ausgesäten LC5-RIC Zellen übertragen wurde. Dieser Test sagt aus, ob behandelte Kulturen infektiöses Virus produzieren und in

den Überstand freisetzen. Bei erfolgreicher Inhibition in Schritt 1 sollte sich das Ergebnis in diesem Test widerspiegeln. Eine Inhibition von HIV-Replikationsschritten nach der Transkription wäre erst in diesem 2. Schritt sichtbar (Kremb et al. 2010). Die Fluoreszenzmessung des Schrittes 2 fand 72 Stunden nach der Übertragung des Überstandes statt. Zur Messung der Rotfluoreszenz wurde das Medium restlos abgenommen und die Fluoreszenz bei 552 nm Anregung und 596 nm Emission im Tecan Infinite M200 Plattenleser gemessen (2.2.1.10).

Die Ergebnisse wurden in Microsoft Excel auf die jeweiligen Positiv- (nur Zellen mit Virus; kein Inhibitor; 100% Infektion) und Negativkontrollen (nur Zellen; kein Virus, kein Inhibitor; 0% Infektion) normalisiert. Dazu wurden zuerst die Mittelwerte der Positiv- (MWpos) und Negativkontrollen (MWneg) ermittelt. Die Berechnung der Infektionsstärken in % erfolgte nach folgender Rechnung:

$$\% \text{ Infektion} = (\text{gemessener Wert X} - \text{MWneg}) / \text{MWpos}$$

Replikate wurden gemittelt und Standardabweichungen bestimmt. Die so erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten in Prozent wurden nun zur weiteren Auswertung wie zum Beispiel Erhebung der EC₅₀- und LD₅₀-Werte nach GraphPad Prism 5.0 übertragen. Kurvenfits wurden mit der mathematischen Gleichung für sigmoidale Dosis-Wirkungsrelation mit variabler Steigung und der Einschränkung Top = 100 und Bottom = 0 durchgeführt.

2.2.1.10 Analyse mit dem Infinite M200 (Tecan)

Der Infinite M200 ist ein Plattenlesegerät, mit dem sich Mikrotiterplatten auslesen lassen. Der Infinite M200 ist ein Fluorometer mit Monochromatorfunktion, bei dem sich spezifisch eine Wellenlänge spektral isolieren lässt, um genaue Messungen zu gewährleisten. Somit können optimale Anregungs- und Messwellenlängen von Fluoreszenzproteinen ermittelt und eingestellt werden. Für DsRed1 wurden die Anregungs-/Emissionswellenlängen 552/ 596 nm verwendet.

2.2.1.11 Viabilitäts-Test (MTT-Test)

Zur Quantifizierung der Toxizität von Stoffen auf eukaroytische Zellen wurde ein Test durchgeführt, bei dem die Intensität einer Farbreaktion die Stoffwechselaktivität in der Zelle anzeigt (Mosmann 1983). Die Farbreaktion ergibt sich daraus, dass der gelbe Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) durch NAD(P)H-abhängige Enzyme des ER und mitochondrielle Enzyme (z.B. Succinat-Dehydrogenase) zum dem violetten Farbstoff Formazan reduziert wird, wobei die Enzyme in toten oder absterbenden Zellen diese Reduktion nicht, bzw. nicht so effizient durchführen können wie Enzyme lebender Zellen (Berridge et al. 1996). Dabei wurde den Zellen 100 µl MTT-Lösung pro ml Medium zugegeben und anschließend für mindestens drei Stunden im

Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Nach der 3-stündigen Inkubation wurde die MTT-Lösung vorsichtig entfernt, 100 µl Lyselösung zur Lyse der Zellen wurde zugegeben und durch vorsichtiges Schütteln der Mikrotiterplatten wurden die freigesetzten Formazan-Kristalle vorsichtig gelöst. Die Messung der Formazan-Konzentration erfolgte im Infinite M200-Plattenlesegerät (Tecan) (2.2.1.10) bei einer Test-Wellenlänge von 570nm und einer Referenz-Wellenlänge von 630nm.

2.2.1.12 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für Analyse im FACSCanto II

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden $1 \cdot 10^6$ der zu färbenden Zellen für 5 Minuten bei 500 xg und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2% Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl 1% Saponin/ PBS für 10 Minuten bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 10% FKS/ PBS und für 30 Minuten bei RT fixiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen für 2 Stunden mit 100 µl von einem Gag-p24 Antikörper (Maus, 1:100 in PBS) im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus; AlexaFluor®633-gekoppelt; 1:100 im Dunkeln) inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin noch zweimal mit PBS gewaschen und schließlich wieder in 2% PFA aufgenommen und danach im FACSCanto II analysiert (2.2.1.18).

2.2.1.13 Time-of-Addition Assay

Für den Time of Addition Assay (Kremb et al. 2010, Daelemans et al. 2011) wurden wiederum am Vortag Zellen in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro 100 µl in 96-well Platten ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe der Substanzen in sequentiellen Zeitintervallen, beginnend mit 0 Stunden, also der zeitgleichen Zugabe des Virus und der Substanz. Die Konzentrationen der Testsubstanzen betrugen mind. $2 \times EC_{50}$ oder höher, wenn die Zytotoxizität der Substanzen dies zuließ. Das Endvolumen betrug hier 120 µl, die Substanzzugabe erfolgte in Volumen zu 20 µl. Der Überstandsübertrag für den Virus-Release Assay (VRA), die Messung der Rotfluoreszenz (2.2.1.10) und der MTT-Test (2.2.1.11) erfolgten wiederum nach 48 Stunden. Die Messung des VRA erfolgte 72 Stunden nach dem Übertrag des Überstandes von Schritt 1 auf die frischen Zellen.

2.2.1.14 Vorinkubationsassay

Für den Vorinkubationsversuch wurden einerseits die verschiedenen Verdünnungen (100 µg/ml bis 0 µg/ml) von Ci (in diesem Fall Cystus052®) in Triplikaten auf die LC5-RIC Zellen gegeben, drei Stunden später wurden die Zellen gewaschen, damit das ungebundene Ci entfernt wurde und die Zellen wurden mit HIV-1_{LAI} inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die verschiedenen Ci Verdünnungen

mit HIV-1_{LAI} für drei Stunden vorinkubiert und dann auf die LC5-RIC Zellen gegeben. Für einen dritten Ansatz wurde der normale Versuchsaufbau durchgeführt, wo Ci und HIV-1_{LAI} gleichzeitig zu den Zellen gegeben wurde. Die Messung der DsRed1-Fluoreszenz erfolgte wie gewohnt 48 Stunden nach Viruszugabe.

2.2.1.15 Isolierung von intakten Viruspartikeln mittels magnetischer Microbeads

Bei diesem Versuch wurden die CD44-enhaltenden Viren verwendet, die wie in 2.2.1.5 beschrieben hergestellt wurden. Diese Viren (1 ml pro Ansatz) wurden einerseits für ca. zwei Stunden mit Ci (Cystus052®; 200 µg/ml) bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert und als Kontrolle wurden Viren verwendet, die nicht mit Ci inkubiert wurden. Für die beiden Ansätze wurden identische Virusmengen aus derselben Viruspräparation verwendet. Gag-p24-Bestimmungen der beiden Input-Fraktionen spiegelten diese Tatsache wieder: Virusfraktion ohne Ci enthielt 59,7 ng/µl Gag-p24 und Virusfraktion mit Ci 59,9 ng/µl Gag-p24. Nach den zwei Stunden wurden die anti-CD44 magnetischen Microbeads zu den Ansätzen gegeben und wiederum für 30 Minuten bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Ansätze auf Säulchen mit Metallkügelchen in einem Magnetfeld geladen und im Anschluss mit dreimal 400 µl Waschpuffer gewaschen. Sowohl der Durchfluss aus dem Ladeschritt, sowie auch der Durchfluss aus der Waschfraktion wurde für weitere Analysen aufgefangen. Schließlich wurden die Säulchen aus dem Magnetfeld entfernt und die gebundenen Viruspartikel wurden mit 300 µl Medium eluiert. Alle aufgefangenen Fraktionen wurden einerseits auf Gag-p24 Gehalt mit einem Gag-p24 ELISA (2.2.1.8) und andererseits auf Vorhandensein von infektiösem Virus im LC5-RIC Reportersystem (2.2.1.9) getestet.

2.2.1.16 Attachment-Assay und mikroskopische Analyse

Um zu analysieren, ob Ci Extrakte die Anheftung (Attachment) der Viruspartikel an die Zellen inhibieren, wurde GFP-Virus (HIV-1_{NL4-3-iGag-GFP}) verwendet. In dem Versuch wurden auf Deckgläschen in 12-well Platten ausgesäte LC5-RIC Zellen (5*10⁵ Zellen pro Well) für vier Stunden mit Ci (Cystus052®; 100 µg/ml) oder CiPP (Cystus052® Polpyphenole; 100 µg/ml) und 500 µl GFP-Virus inkubiert (0,7 µg/ml Gag-p24). Zusätzlich wurden die Zellen noch mit T-20 (50 nM) behandelt, um den Eintritt der Viren in die Zellen zu verhindern und somit zu einer Akkumulation der Viruspartikel auf den Zellen zu führen. Nach den vier Stunden wurden die Deckgläschen mit den Zellen dreimal gründlich in PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in 2% PFA fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen wieder dreimal in PBS gewaschen und schließlich wurde die DNA in den Zellkernen noch für 15 Minuten mit DAPI (1:10000) gefärbt. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern eingedeckelt und nach 24 stündigem Trocknen des

Mowioles im Dunkeln bei Raumtemperatur konnten die Zellen im Mikroskop (Nikon TiE, ausgestattet mit dem Perkin Elmer UltraView Vox System) analysiert werden. Dazu wurden folgende Expositionszeiten für alle Bildaufnahmen eingestellt: GFP – 100 ms, DAPI – unterschiedlich, Hellfeld – unterschiedlich. Es wurden Bilder aufgenommen und mit der Velocity-Software konnten im Anschluss die GFP-Spots auf den Zelloberflächen gezählt werden. Die DAPI-positiven Zellen wurden händisch ausgezählt, um das Verhältnis GFP-spots pro Zelle zu berechnen.

2.2.1.17 HIV-RNA-Bestimmung

Bei der Untersuchung, ob HIV-RNA in den Zellen gefunden werden kann, nachdem sie mit HIV und Ci (Cystus052®) bzw. CiPP (Cystus052® Polyphenole) inkubiert wurden, wurden LC5-CD4 Zellen verwendet. Diese wurden in 6-well Platten in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät und am nächsten Tag wurden diese Zellen mit HIV-1_{LAI} und Ci bzw. CiPP (100 µg/ml) inkubiert. Als Kontrollen gab es noch Ansätze ohne Virus und ohne Ci/ CiPP und Ansätze nur mit Virus. In alle Ansätze wurde noch Efavirenz (50 nM) zugegeben, damit der Abbau der viralen RNA in den Zellen verhindert wird und diese so akkumulieren kann. Nachdem diese Ansätze für vier Stunden auf den Zellen waren, wurden die Zellen geerntet und die RNA aus diesen Zellen wurde isoliert (2.2.2.8). Diese RNA konnte dann im Lightcycler 480 von Roche auf HIV-RNA Menge analysiert werden (2.2.2.9). Die Primer für die HIV-RNA-Quantifizierung binden in *nef*, als Referenzgen wurde RPII verwendet und die Auswertung wurde wie in Abschnitt 2.2.2.9 beschrieben durchgeführt.

2.2.1.18 FACScanto II Analyse und Auswertung

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie und gekoppelter Fluoreszenzdetektion (FACS = fluorescence activated cell sorting) können Zellen, die Fluoreszenzproteine oder Fluorophore enthalten, detektiert werden. Die Fluorophore der Fluoreszenzmarker werden durch einen Laserstrahl angeregt und die emittierte Fluoreszenz wird mittels Detektoren nachgewiesen. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv, da die Zellen soweit vereinzelt werden, dass jede Zelle einzeln von dem Laser erfasst wird. Zusätzlich zur Fluoreszenz wird über Vorwärts- (forward scatter; FCS) und Seitwärtsstreulicht (sideward scatter; SSC) die Größe und Granularität der Zellen analysiert. Durch Eingrenzen einer Region (Gate) wurde danach eine einheitliche und intakte Zellpopulation definiert, die dann für die weitere Auswertung herangezogen wurde. In einem nächsten Schritt wurden die Zellen weiter eingegrenzt, indem nur transduzierte Zellen (GFP-positiv) im Vergleich zu nicht-transduzierten Zellen (keine GFP-Expression) analysiert wurden. Von diesen GFP-exprimierenden Zellen wurden schließlich die Zellen quantifiziert, die durch das Anfärben von Gag-p24 Proteinen über Immunfluoreszenzfärbung produktive HIV-

Infektion zeigen. Es wurde also untersucht, wieviele (in %) von den transduzierten Zellen (GFP-positiv) gleichzeitig noch Gag-p24 exprimieren.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Restriktionsverdau

Folgende Bestandteile wurden für einen Restriktionsverdau zusammenpipettiert.

Tabelle 4: Ansatz für einen Restriktionsverdau

Zusätze	Mengen
DNA	5 µg
Enzym 1 (NEB)	5-10 Units
Enzym 2 (NEB)	5-10 Units
CutSmart-Puffer (NEB)	3 µl
Milli-Q	auf 30 µl auffüllen

Inkubation des Ansatzes erfolgte für zwei Stunden bei 37°C.

Bei dem Verdau eines Plasmids für eine Klonierung wurden mindestens 5 µg des entsprechenden Plasmids eingesetzt und die entsprechende Menge Enzym. Wurde bei dem Verdau ein DNA-Fragment aus dem Plasmid herausgeschnitten, mussten die entstandenen Fragmente per Gelelektrophorese getrennt werden. Danach konnte die richtige Bande aus dem Gel aufgereinigt (2.2.2.3) und für eine Ligation (2.2.2.5) verwendet werden.

Ein analytischer Restriktionsverdau erfolgte nach demselben Schema, wobei hier analysiert wurde, ob das bei dem Verdau erwartete, plasmidspezifische Bandenmuster zu sehen war.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Proben mit einem 5 x Green GoTaq-Puffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Dieses wurde dann in 1 x TAE-Laufpuffer liegend für etwa 30 Minuten einer Spannung von 80-100 V ausgesetzt. Als Größenstandard wurde die 2-log DNA Ladder von NEB verwendet. Um die DNA später sichtbar zu machen, wurde dem Agarosegel

Ethidiumbromid (5 µl auf ein 50 ml Gel) hinzugefügt. Dieses interkaliert in die DNA-Helix und emittiert bei Anregung mit UV-Licht (312 nm) orangefarbenes Licht. Der Nachweis erfolgte mit der ChemiDoc-Geldokumentationsanlage und wurde photographisch festgehalten.

2.2.2.3 Reinigung von DNA aus Agarosegelen über NucleoSpin® Extract II

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel. Alle zur Aufreinigung verwendeten Puffer sind Bestandteil des Kits. Mit Hilfe dieses Kits ist es möglich, nach einem Restriktionsverdau (2.2.2.1) und Auftrennung der Produkte auf einem Agarosegel (2.2.2.2) diese aus dem Gel zu extrahieren. Die Extraktion erfolgte wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben.

2.2.2.4 PCR

Bei einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kann ein bestimmtes DNA-Fragment amplifiziert werden. Dabei ist es zusätzlich möglich, die Enden des DNA-Fragmentes zu modifizieren, indem z.B. bestimmte Schnittstellen für Restriktionsenzyme über spezifische Primer angefügt werden.

Tabelle 5: Ansatz für eine PCR

Zusätze	Mengen
GoTaq-Puffer (5x)	10 µl
Nukleotid-Stammlösung (10mM)	2 µl
Primer Fw (10µM)	1 µl
Primer Rev (10µM)	1 µl
GoTaq-Polymerase	2-3 Units
Plasmid (500-1000 µg/µl)	0,5 µl
Milli-Q	auf 50 µl auffüllen

Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Block mit folgendem Programm durchgeführt: 5 Minuten 95°C zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA. Darauf folgten 35 Zyklen, die wie folgt aufgebaut sind: 95°C für 30 Sekunden zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA, 56°C für 30 Sekunden zum Hybridisieren der Primer mit der DNA und 72°C für 45 Sekunden zur Verlängerung der Primer

komplementär zum vorliegenden Basenstrang. Danach wurden die Reaktionen auf 4°C abgekühlt und konnten sofort weiter verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden.

Durch Auftragen des kompletten PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel konnte das Amplifikationsprodukt überprüft werden und durch Aufreinigen der DNA-Bande aus dem Gel (2.2.2.3) und Verdau mit den passenden Restriktionsenzymen (2.2.2.1) konnte nun dieses DNA-Fragment für Ligationen (2.2.2.5) verwendet werden.

2.2.2.5 Ligation

Im Anschluss an den Restriktionsverdau des Vektors (2.2.2.1) und die Aufreinigung aus dem Agarosegel (2.2.2.3) erfolgte die Ligation, zum Verschließen des Vektors mit dem gewollten Insert um damit einen intakten Vektor zu erhalten, den man für Transfektionen verwenden kann.

Tabelle 6: Ansatz für eine Ligation

Zusätze	Mengen
T4-DNA Ligase Puffer	5 µl
T4-DNA Ligase	1 µl
Vektor (verdaut und aufgereinigt)	100 ng
Insert (verdaut und aufgereinigt)	X ng
Milli-Q	auf 50 µl auffüllen

Für den Liagtionsansatz wurden folgende Komponenten in ein Eppendorf-Regenzgefäß vereinigt: 5 µl Rapid Ligation Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase, 3 µl Nukleasefreies Wasser, 100 ng des verdauten und aufgereinigten Vektors und einen dreifachen, molaren Überschuss des Inserts im Vergleich zu dem Vektor. Die DNA-Menge des Inserts lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$[(\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}) : \text{kb Vektor}] \times \text{molares Verhältnis Insert zu Vektor} = \text{ng Insert.}$$

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2.6 Transformation

Bei der Transformation wird freie DNA von Zielorganismen, meistens *E.coli*-Zellen, aufgenommen und vervielfältigt. Dazu wurden Zellen des chemisch kompetenten *E.coli*-Stammes XL-10 Gold verwendet, welcher sich besonders für die Transformation von ligierten Plasmiden eignet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl in ein vorgekühltes Plastikreagenzgefäß überführt und mit 2 µl des mit den Zellen gelieferten β-Mercaptoethanol-Mixes versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. 4 µl des Vektors oder des Ligationsansatzes wurden zugegeben, durch Rühren mit einer Pipettenspitze vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für genau 30 Sekunden bei exakt 42°C, nach welchem der Ansatz sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gelagert wurde.

Nach der Zugabe von 450 µl SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension bei 37°C und 150 rpm für 1 Stunde im Thermomixer geschüttelt. Während dieser Zeit entwickelten die erfolgreich transformierten Bakterien die auf dem Vektor kodierte Ampicillin-Resistenz und konnten somit auf LB-Amp Selektionsplatten wachsen. Nach der einstündigen Inkubation wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Sind Kolonien gewachsen, wurden diese am nächsten Tag gepickt und in 5 ml LB-Medium über Nacht hochgezogen. Daraus konnten am darauffolgenden Tag in einer Plasmid-Mini-Präparation (2.2.2.7) die Plasmide isoliert werden. Wurde die Korrektheit des Inserts durch einen Restriktionsverdau (2.2.2.1) und über Sequenzierung bestätigt, wurde eine große Kultur (300 ml) angeimpft und daraus wiederum die Plasmide in einer Plasmid-Maxi-Präparation extrahiert (2.2.2.7).

2.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmid-Mini-Präparation wurde verwendet, um nach einer Klonierung in kleinem Format die Plasmide aus den Bakterien aufzureinigen. Die Präparation wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel und nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zur Bestätigung der Intaktheit des Klons wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt und schließlich 100 µl der jeweiligen Plasmid-Mini-Präparation von der Firma MWG auf das Vorhandensein und die richtige Orientierung des Inserts sequenziert (Tabelle 26).

Plasmid-Maxi-Präparation

Da für die verschiedenen Versuche größere Mengen an Plasmid benötigt wurden, wurde auch noch eine Plasmid-Maxi-Präparation mit dem NucleoBond® Plasmid Purification Kit von Macherey-Nagel nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zur Kontrolle auf Intaktheit des aufgereinigten Plasmids wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt (2.2.2.1) und im Anschluss die DNA-Menge des aufgereinigten Plasmids im Nanodrop 2000 bestimmt.

2.2.2.8 RNA-Isolation

Für jede RNA Isolation in dieser Arbeit wurde das Kit RNeasy Mini Kit von Quiagen verwendet. Für die RNA-Isolation wurden $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen mit 350 bis 600 µl RLT-Puffer versetzt, mehrmals auf- und abpipettiert und dadurch lysiert. Dem Puffer RLT wurden vorher 1% β-Mercaptoethanol zugesetzt, was den Abbau der RNA verhindern soll. Die Zelllysate wurden zur weiteren Zerstörung der Zellen und Zellkerne auf QIAshredder Säulen geladen und für zwei Minuten bei Raumtemperatur und mehr als 17000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA-Isolation laut des Herstellerprotokolls mit dem optionalen Schritt für den DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Zur Elution der RNA wurde das Säulchen in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 50 µl RNase-freies Wasser wurden in das Säulchen pipettiert und dieses dann bei mehr als 11000 xg für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurde die RNA-Menge im Nanodrop 2000 bestimmt und anschließend bei -80°C weggefroren und konnte für qRT-PCR Experimente (2.2.2.9) verwendet werden.

2.2.2.9 qRT-PCR

Die qRT-PCR Experimente in dieser Arbeit wurden immer mit einem One-Step PCR Kit (KAPA SYBR FAST One-Step LC480; KAPA Biosystems) durchgeführt, bei dem der Schritt der reversen Transkription der RNA zu DNA in die eigentlich qRT-PCR-Reaktion inkludiert ist. Zu diesem Zweck wurden in jeden Reaktionsansatz in der qRT-PCR-96-well Platte (4titude) folgende Komponenten pipettiert:

Tabelle 7: Ansatz für eine qRT-PCR

Zusätze	Mengen
RNase freies Wasser	3,4 µl
2x KAPA SYBR® FAST qRT-PCR Master Mix	10 µl
RT-Mix (50x)	0,4 µl
dUTP-Mix (10 mM)	0,4 µl
Forward Primer (10 µM)	0,4 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,4 µl
Template RNA (10 ng/µl)	5 µl

Jede qRT-PCR-Reaktion wurde in Duplikaten mit den Primerpaaren für die Zielsequenz und auch in Duplikaten mit den Primerpaaren für das Referenzgen (immer RPII, außer bei der Analyse der Referenzgene) angesetzt. Zusätzlich wurde auch noch eine Kontaminationskontrolle für jedes Primerpaar mitlaufen gelassen, wo anstatt RNA dieselbe Menge an RNase-freiem Wasser eingesetzt wurde. Das Protokoll für die qRT-PCR-Reaktion lief nach folgendem Schema ab:

Tabelle 8: qRT-PCR Protokoll

Schritt, Zyklen	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription; 1 Zyklus	42 °C	5 Minuten
	95 °C	3 Minuten
Amplifikation; 40 Zyklen	95	10 Sekunden
	60	20 Sekunden
	72	5 Sekunden

Schmelzkurve; 1 Zyklus	95	1 Sekunde
	65	15 Sekunden
	Graduell aufsteigend bis 95 °C	0,11 °C pro Sekunde
Abkühlen	4°C	Bis zum Ende

Für die Auswertung des qRT-PCR-Laufs, wurde die ‚second derivative maximum‘-Methode verwendet, mit der die Cp-Werte berechnet werden konnten (Pfaffl 2001). Der Cp-Wert ist die Nummer des Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve in einen exponentiellen Anstieg übergeht. Für die Berechnung der Expressionsmengen im Vergleich zu einem Referenzgen wurde folgende Formel verwendet: $2^{-\Delta C_p}$, wobei ΔC_p die Differenz zwischen dem Cp-Wert der Zielsequenz und dem Cp-Wert des Referenzgens darstellt. Somit ist die Formel für die Expression der Zielsequenz im Vergleich zur Expression des Referenzgens folgende: $2^{-(C_{pZielsequenz}-C_{pReferenzgen})}$.

2.2.3 Proteinanalytik

2.2.3.1 Ernte von Zellen für eine Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Westernblot

Um die gewünschten Proteine im Westernblot untersuchen zu können, wurden die entsprechenden Zellen geerntet (zwischen $1 \cdot 10^6$ (Astrozyten) und $1 \cdot 10^7$ (Jurkat Zellen) und lysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 100-150 µl PNL-Lysepuffer mit 1% PEFA-Proteaseinhibitor für 5-10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Lysat noch für 1 Minute bei 1000 xg bei 4°C abzentrifugiert. Die zellfreien Lysate wurden schließlich 4:1 mit NuPAGE® LDS Sample Buffer 4x (Novex®Invitrogen) vermischt und zum Denaturieren der Proteine für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Diese Lysate konnten schließlich in eine SDS-PAGE (2.2.3.2) für die Analyse der Zielproteine eingesetzt werden.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese musste ein SDS-Gel gegossen werden. Dazu wurden die Glasplatten und die Dichtungsgummis mit 80%igem Ethanol sauber gemacht und zusammengebaut. Die SDS-Trenngele in dieser Doktorarbeit haben standardmässig einen Acrylamidgehalt von 12,5% enthalten und wurden nach folgendem Protokoll angesetzt:

Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Trenngels

Zusätze	Mengen
H ₂ O	5,1 ml
Lower-Tris	3,9 ml
30% Acrylamid	6,5 ml
TEMED	23 µl
10% APS	42 µl

Sobald APS und TEMED zugegeben wurden, musste das Gel sofort bis ca. 1 -2 cm unter die obere Plattenkante gegossen werden, bevor es auspolymerisiert und schließlich noch mit Isopropanol überschichtet wurde, damit das Gel luftdicht abgeschlossen war. Nach ca. 30 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert und das Sammelgel konnte angesetzt und über das Trenngel bis obenhin zwischen die Glasplatten gegossen werden:

Tabelle 10: Zusammensetzung des SDS-Sammelgels

Zusätze	Mengen
H ₂ O	2,5 ml
Lower-Tris	1 ml
30% Acrylamid	700 µl
TEMED	7,5 µl
10% APS	42 µl

Sofort im Anschluss wurde der Kamm mit der gewünschten Anzahl und Größe der Ladetaschen in die dafür vorgesehene Aussparung gesteckt und auch das Sammelgel konnte schließlich auspolymerisieren.

Für die SDS-PAGE wurden nun diese Gele in die Laufkammer (Biometra) eingespannt, wobei vorher der Dichtungsgummi und der Kamm für die Ladetaschen entfernt wurden und die Laufkammer schließlich mit Laufpuffer (Lämmli-Puffer) bis zu den jeweiligen Markierungen aufgefüllt wurde. Mit einer Spritze wurden die Taschen mit dem Laufpuffer ausgespült, um Gelreste zu entfernen. Die gewünschte Menge an Zelllysaten (2.2.3.1) und Größenstandard (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) wurden in die Taschen geladen, der Deckel der Laufkammer wurde befestigt und die Stromkabel wurden an den Powersupply angeschlossen und angeschaltet. Während die Laufrichtung im Gel durch das Sammelgel lief, wurde eine Spannung von 80 V angelegt und danach dann eine Spannung von 150 V bis die Laufrichtung schließlich die untere Seite des SDS-Gels erreicht hatte. Im Anschluss konnte das Gel in einem Westernblot (2.2.3.3) weiter untersucht werden.

2.2.3.3 Westernblot

Um einen Westernblot durchzuführen, mussten die Proteine, die durch die SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dazu wurde das iBlot®-System von Invitrogen mit den dafür vorgesehen fertigen Blottingstacks nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Das Blottingprogramm lief für sieben Minuten, nach denen der Blottingvorgang abgeschlossen war und die Nitrocellulosemembran entnommen werden konnte und für ca. 20 Minuten in 5% (w/v) Milchpuffer geblockt wurde. Im Anschluss wurde der gewünschte erste Antikörper in der jeweilig eingesetzten Verdünnung in 5% Milchpuffer auf die Membran gegeben und entweder ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit PBST gewaschen und danach in Milchpuffer mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper für ca. 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Membran wieder dreimal mit PBST gewaschen und danach noch einmal für 10 Minuten mit PBS. Durch Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates für die Peroxidase konnte die Lokalisation der Zielproteine auf der Membran erfolgen. Dazu wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und nach der gewünschten Zeit (10 Sekunden bis 10 Minuten) wieder abgenommen und in einer Filmentwicklermaschine entwickelt, wobei die Schwärzung des Films die Lokalisierung der Proteine aufzeigte.

2.2.4 Herstellung pflanzlicher Extrakte

2.2.4.1 Bearbeitung des Cystus052®-Suds

Der Sud wurde käuflich erworben von der Firma Dr. Pandalis Urheimische Medizin. Der Sud wurde eingedampft und enthielt pro ml des eingedampften Suds 6,2 mg Trockenmasse Ci. Diese

eingedampften Ci Trockenmasse wurden wiederum in dem entsprechenden Zellkulturmedium in den gewünschten Konzentrationen (z.B. 100 µg Trockenmasse Ci pro ml Zellkulturmedium = 100 µg/ml) gelöst für die Durchführung der Experimente.

2.2.4.2 Herstellung des *Cystus incanus*-Tee Extraktes (Ci Tee)

Für die Herstellung eines eigenen Extraktes von *Cystus incanus* wurde ein im Handel erhältlicher Tee dieser Pflanze (Dr. Pandalis Urheimische Medizin) verwendet. Der Tee (50g) wurde direkt in 1l Milli-Q für eine Stunde auf einer Heizplatte unter Rühren aufgekocht, danach bei 4000 xg zentrifugiert, steriltriftriert und eingedampft. Pro ml des eingedampften Suds erhielt man 7,4 mg Trockenmasse Ci. Diese eingedampften Ci Trockenmasse wurden wiederum in dem entsprechenden Zellkulturmedium in den gewünschten Konzentrationen (z.B. 100 µg Trockenmasse Ci pro ml Zellkulturmedium = 100 µg/ml) gelöst für die Durchführung der Experimente.

2.2.4.3 Herstellung der Extrakte der lebenden *Cystus incanus* Pflanzen

Für die Herstellung der Extrakte der frischen Pflanze wurde eine Pflanze komplett von Erde befreit und in Wasser gewaschen. Im Anschluss dazu erfolgte ein kurzes Bad in Ethanol, um auch wirklich alle Verunreinigungen zu entfernen. Danach wurden die manuell zerkleinerten Pflanzenbestandteile für eine Stunde in Milli-Q gekocht. Bei einer Pflanze wurden die Pflanzenbestandteile (Blätter, Stängel, Wurzel) getrennt voneinander extahiert, bei einer weiteren Pflanze wurden alle Pflanzenbestandteile gemeinsam extrahiert. Die Extrakte wurden steriltriftriert, eingedampft und anschließend in Zellkulturmedium für die Durchführung der Versuche gelöst.

2.2.4.4 Anreicherung der polyphenolischen Bestandteile aus Ci

Mithilfe des Stoffes Polyvinylpyrrolidon (PVPP) können die polyphenolischen Bestandteile aus der Ci-Rohfraktion aufgereinigt werden (Magalhães et al. 2010, Helfer et al. 2014). Dazu wurde der Cystus052®-Sud oder der Sud aus dem Teekraut (Ci Tee) mit 25 g pro 500 ml Sud PVPP versetzt und für 15 Minuten unter permanentem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4000 xg für 15 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen, zweimal mit H₂O gewaschen und jedesmal wieder bei 4000 xg für 15 Minuten abzentrifugiert. Das PVPP-Pellet wurde in 15 ml 0,5M NaOH aufgenommen zur Elution der Polyphenole. Die Suspension wurde anschließend wieder abzentrifugiert (4000 xg; 15 Minuten) und der polyphenol-enthaltende Überstand konnte mit HCl wieder auf pH6 eingestellt werden. Zur finalen Aufreinigung der Fraktionen wurde eine Festphasenextraktion (Solid-Phase Extraction; SPE; 2.2.4.5) durchgeführt. (Übersicht über die Anreicherung: Abbildung 15)

2.2.4.5 Festphasenextraktion (SPE) von *Cystus incanus*

Nach der Polyphenolanreicherung können noch Verunreinigungen und Salze in den Extrakten vorhanden sein und mittels einer SPE ist es möglich diese Verunreinigungen zu entfernen. Für die SPE des polyphenolangereicherten Extraktes wurde eine C18-Säule von Varian verwendet. Die Säule wurde mit 1 ml MeOH/1% Ameisensäure equilibriert. 1ml des Cystus-Extraktes (10 mg/ml) wurde auf die Säule geladen wobei die organischen Bestandteile des Extraktes über sekundäre Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte) an die C18-Kieselgel-Matrix gebunden haben. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 1 ml hochreinem Wasser. Im Anschluss wurde eine Fraktion mit 100% Methanol eluiert. Das Eluat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Nach Eindampfen und Lösen der Fraktionen in hochreinem Wasser wurde die anti-HIV Aktivität der angereicherten Fraktion im EASY-Hit System bestimmt.

2.2.5 Statistik

Für die Statistische Analyse wurde jeweils der ungepaarte Student's t-Test verwendet, um zu analysieren, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Populationen bzw. Versuchansätzen besteht. Ein signifikanter Mittelwertsunterschied war gegeben bei $p \leq 0,05$.

2.2.6 Fraktionierung des Cystus052® Extraktes durch die Firma Bicoll GmbH

Die Fraktionierung des Cystus052® Rohextraktes erfolgte durch das proprietäre Verfahren BIFRAC N der Firma Bicoll. Im Anschluss an die Fraktionierung hat die Firma auch in unserem Auftrag eine Strukturaufklärung der interessanten Reinstoffe durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Einflusses der zellulären HIV-1 Inhibitorfamilie Risp/ Fam21 auf die HIV-1 Replikation

3.1.1 Expressionsanalyse von Risp/Fam21 RNA-Transkripten in Zelllinien und primären Zellen

Bisher wurden Untersuchungen der HIV-inhibierenden Wirkung der Risp/ Fam21 Proteine hauptsächlich in Astrozyten durchgeführt. Es ist also bekannt, dass die endogenen Risp/ Fam21 Proteine in diesen Zellen exprimiert werden. Jedoch gibt es keine Informationen darüber, ob diese Proteine in anderen Zelllinien oder auch in primären Zellen exprimiert werden und ob es Unterschiede in der Menge an exprimiertem Protein gibt. Die quantitative Untersuchung der Proteinmengen erwies sich als schwierig, da die Komplexität der Proteinfamilie aufgrund der vielen Proteinisoformen und unterschiedlichen Expressionsmuster in den verschiedenen Zellen eine verlässliche Analyse erschwert und zusätzlich kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand. Stattdessen wurden die RNA-Mengen von Risp/ Fam21 Transkripten analysiert.

3.1.1.1 Etablierung eines qRT-PCR Assays

Für die Bestimmung der Risp/ Fam21 RNA Mengen musste zuerst ein Assay etabliert werden, mit dem diese reproduzierbar und verlässlich gemessen werden können. Bisher wurde noch kein Assay zur Messung der Risp/ Fam21 RNA publiziert, weshalb ich mich gezielt auf die Etablierung dieses Assays fokussiert habe.

Auswahl der Risp/ Fam21 Primer:

Für die Messung der Risp/ Fam21 RNA Mengen ist es notwendig einen Primer zu finden, der spezifisch diese Genprodukte erkennt und keine anderen Sequenzen amplifiziert und somit das Resultat verfälscht. Da, wie bereits erwähnt, vier verschiedene Gene existieren, die über unterschiedliche Spleißvarianten für insgesamt 15 prognostizierte, funktionelle Risp/ Fam21 Proteinisoformen codieren, mussten die Primer so gelegt werden, dass sie möglichst alle mRNAs die von diesen Genen transkribiert werden, erkennen. Die 16.4.1 Region kommt in allen Risp/ Fam21 Transkripten der Datenbank Ensembl (www.ensembl.org) und der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vor und zeigt eine 90%ige Übereinstimmung auf Nukleotidebene (siehe dazu auch Anhang 2). Für diese Analyse wurden alle Risp/ Fam21 cDNA Sequenzen in den Datenbanken daraufhin untersucht, ob sie für funktionelle Proteine kodieren. Dies war für 15

Sequenzen der Fall, worauf diese schließlich miteinander aligned wurden um die Übereinstimmung der 16.4.1-Sequenz auf Nukleotidebene zu analysieren (Anhang 2). Aufgrund der hohen Übereinstimmung habe ich diese Region zur Platzierung der Primer ausgewählt. In Abbildung 7 sind sechs verschiedene Primerpaare zu sehen. Diese decken die komplette 16.4.1-Region ab und sollten schließlich auf Funktionalität getestet werden.

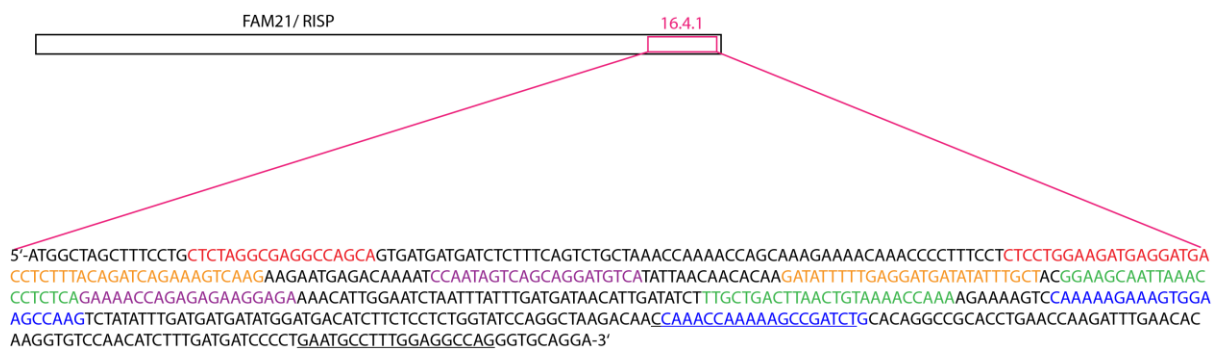


Abbildung 7: Übersicht über die getesteten Risp/ Fam21 Primer. Design von sechs verschiedenen Primerpaaren in der 16.4.1-Region für die Etablierung eines qRT-PCR Protokolls zur Analyse der Risp/ Fam21-Mengen in diversen Zelltypen. Die jeweiligen Primerpaare sind farblich markiert, bzw. durch Unterstreichen gekennzeichnet. Der erste Primer eines jeweiligen Farbpaares stellt den ‚forward‘-primer dar und der jeweils zweite Primer den ‚reverse‘-Primer. Das grüne Primerpaar ist das Primerpaar, das sich am Ende als am besten geeignet herausstellte und für die Etablierung der qRT-PCR verwendet wurde.

Die in Abbildung 7 farblich bzw. durch Unterstreichen markierten Primerpaare wurden alle in qRT-PCR Reaktionen getestet. Primerpaar 3, welches in der Abbildung grün markiert ist, stellte sich als das Einzige heraus, bei dem keine multiplen Peaks in den Schmelzkurven zu entdecken waren. Dies lässt darauf schließen, dass die anderen Primerpaare unspezifisch noch andere Sequenzen amplifizieren, und nur Primerpaar 3 (im Folgenden Risp-Primer genannt) spezifisch nur ein gewünschtes Produkt amplifizierte. Zusätzlich wurden die Produkte der qRT-PCR auf Agarose-Gele aufgetragen und auch hier war zu sehen, dass die Produkte des Risp-Primers nur eine Bande ergaben (Daten nicht gezeigt). Die Sequenz die von dem Risp-Primer abgedeckt wird, zeigt eine 100%ige Übereinstimmung in allen Transkripten der bereits genannten Datenbanken (Anhang 2).

Auswahl eines geeigneten Referenzgens:

Zur relativen Quantifizierung werden die RNA-Kopienzahlen des Testgens auf die RNA-Mengen eines in den gleichen Zellen exprimierten Referenzgens bezogen. Idealerweise ist die RNA-Menge der

Referenzgene vergleichbar in den verschiedenen zu testenden Zelltypen und wird durch äußere Einflüsse wie z.B. Infektion mit HIV oder sonstige Behandlungen der Zellen nicht beeinträchtigt. Um ein solches Referenzgen zu finden, wurden elf verschiedene sogenannte House-Keeping-Gene getestet. Die Übersicht über die getesteten House-Keeping Gene und die Kriterien für die Auswahl sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Auswahl eines geeigneten House-Keeping Gens (HKG) als Referenzgen für die relative, quantitative RT-PCR. Primer für die in der ersten Spalte links aufgeführten HKG wurden unter folgenden Kriterien analysiert: Spezifität der Primer (Schmelzkurvenanalyse; nur ein Peak in der Schmelzkurve), Analyse der Amplifikationskurve (Kurve mit exponentiellem Anstieg und Beibehalten des Maximalwerts) und geringe Variation in verschiedenen Zelltypen unter verschiedenen Bedingungen (u.a. behandelt mit IL-2, unbehandelt, infiziert oder nicht infiziert). Zwei House-Keeping Gene entsprachen allen diesen Kriterien: 18S ribonucleäre RNA (18S rib RNA) und RNA-Polymerase II (RP II).

HKG	Schmelzkurven-analyse	Analyse der Amplifikations-kurven	Geringe Variation in versch. Zellen
beta-2-microgl	-	+	+
GAPDH	+	+	-
PGK 1	+	+	-
TATA bbp	-	+	-
beta actin	-	+	+
18S rib RNA	+	+	+
rib prot L13a	-	+	+
beta tubulin	-	+	-
HRPT	+	+	-
G6PD	-	-	+
RP II	+	+	+

In der ersten Spalte links in der Tabelle 11 sind die elf verschiedenen HKG aufgeführt, die getestet wurden, um sie als Referenz für eine relative Quantifizierung der Risp/ Fam21 RNA Menge in einer qRT-PCR heranzuziehen. Dazu wurden die Schmelz- und Amplifikationskurven von Test-qRT-PCR Reaktionen analysiert. Um ein + bei der Schmelzkurven-analyse zu erhalten, durfte nur ein Peak in der Schmelzkurve zu finden sein. Dies traf für fünf der getesteten HKG zu. Bei der Analyse der Amplifikationskurven wurde betrachtet, ob die Amplifikationskurve ab einem gewissen Zeitpunkt (Cp-Punkt) exponentiell steigt und sich schließlich einem Plateau annähert. Bei G6PD war dies nicht der Fall, da hier der Maximalwert der Amplifikationskurve nicht beibehalten wurde und die Kurve wieder absank. Des Weiteren wurde analysiert, ob die HKG eine geringe Variation in verschiedenen Zelllinien, primären Zellen und HIV-1 infizierten Zellen aufwiesen. Dies war auch für mehrere HKG der Fall. Zwei HKG (18S rib RNA und RPII) zeigten sehr positive Ergebnisse bei diesen Kriterien. Um zwischen diesen beiden HKG zu entscheiden wurde noch ein weiteres Kriterium analysiert: Da 18S rib RNA einen sehr geringen Cp Wert aufweist, wurde untersucht, ob die Menge, die von diesem HKG in den Zellen vorliegt, bereits im Sättigungsbereich der Nachweismethodik liegt. Dazu wurden Verdünnungsreihen der RNA Templates angefertigt und mit beiden möglichen HKG-Kandidaten getestet. Dabei stellte sich heraus, dass auch bei einer Verdünnung von 1:10 keine Veränderung der Menge an 18S rib RNA Amplifikationsprodukt zu erkennen war. Dies deutete auf eine Sättigung dieser Amplifikatmengen hin. Somit werden kleine Schwankungen in den Amplifikatmengen nicht erkannt und können das Ergebnis verfälschen. Bei RPII war dies nicht der Fall, wodurch RPII als Referenzgen für alle folgenden qRT-PCR Reaktionen mit relativer Quantifizierung verwendet wurde.

3.1.1.2 qRT-PCR Analyse der Risp/ Fam21 RNA Mengen in verschiedenen Zelllinien und primären Zellen

Zusätzlich zu der Auswahl der Risp-Primer und des geeigneten Referenzgens wurden auch verschiedene Protokolle und qRT-PCR-Kits getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass ein One-Step Kit, bei dem die reverse Transkription von RNA in cDNA bereits in die eigentliche qRT-PCR Reaktion eingebunden ist, die reproduzierbarsten und verlässlichsten Resultate erzeugte. Nach der Etablierung des Assays habe ich mehrere Zelllinien und primäre Zellen mit dieser Methodik getestet. Darunter finden sich mehrere Astrozytenzelllinien (85HG66, U138MG) und die persistent HIV-1 infizierten TH4-7-5. Diese Zellen wurden aufgrund der Tatsache ausgewählt, dass bisherige Ergebnisse über die anti-HIV Aktivität von Risp/ Fam21 in Astrozyten untersucht wurden. Desweiteren wurden HIV-Zielzellen untersucht: Monozyten (Thp1) und T-Zellen (Jurkat). Schließlich

wurden noch Zellen analysiert, die typischerweise in der HIV-Forschung verwendet werden. Abbildung 8A zeigt, dass in allen untersuchten Zelllinien Risp/ Fam21 RNA nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren sind Unterschiede in den Expressionsstärken erkennbar. Die Astrozyten-Zelllinien zeigen eine stärkere Expression von Risp/ Fam21 RNA als die anderen getesteten Zelllinien. Zusätzlich wurden auch periphere Mononukleäre Zellen aus Blut (PBMCs), die aus Buffy-Coats isoliert und danach 3 Tage entweder mit (PBMC + PHA) oder ohne (PBMC – PHA) PHA (Phytohämagglutinin) -Stimulation immer in der Anwesenheit von 20 U/ml humanem Interleukin 2 (hIL-2) kultiviert wurden, analysiert. Ein Teil der stimulierten PBMCs wurde auch mit HIV-1 infiziert (PBMC + PHA inf). Zusätzlich wurden auch aus Monozyten differenzierte Makrophagen (monocyte-derived macrophages; MDM) untersucht (Abbildung 8B). Auch in all diesen primären Zellen ist Risp/ Fam21 RNA detektierbar.

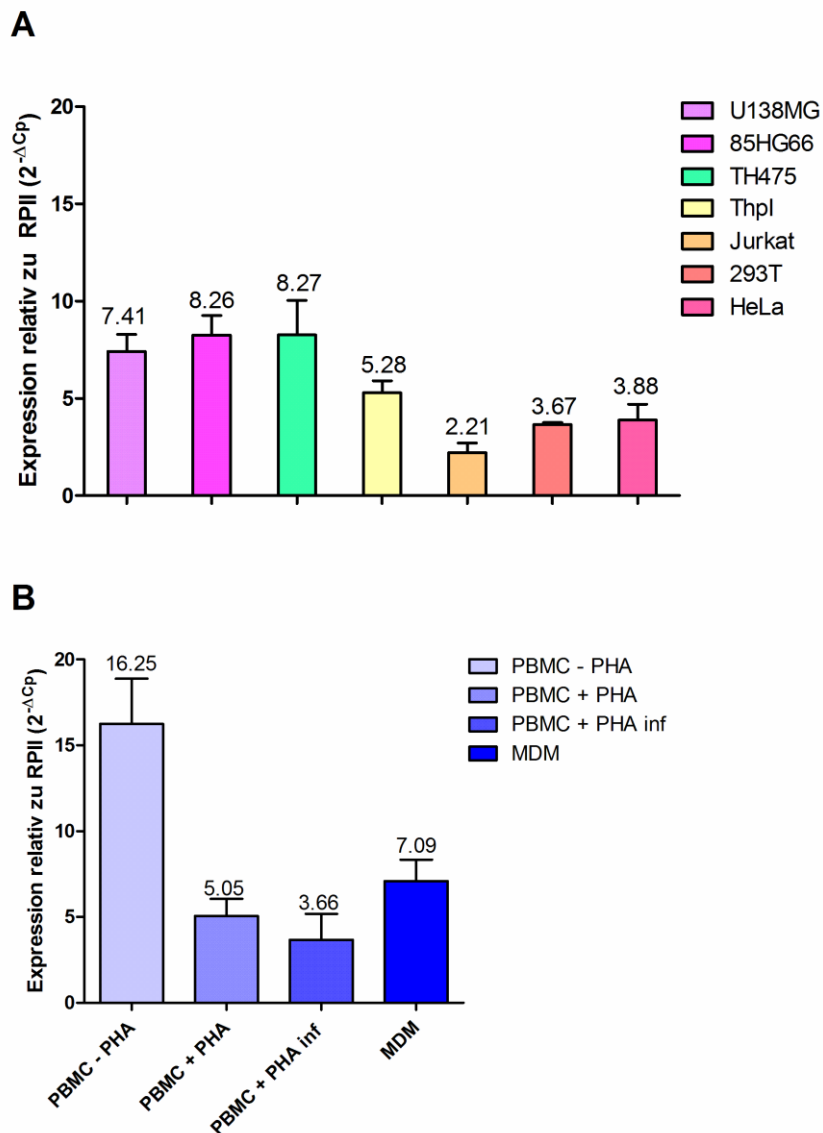


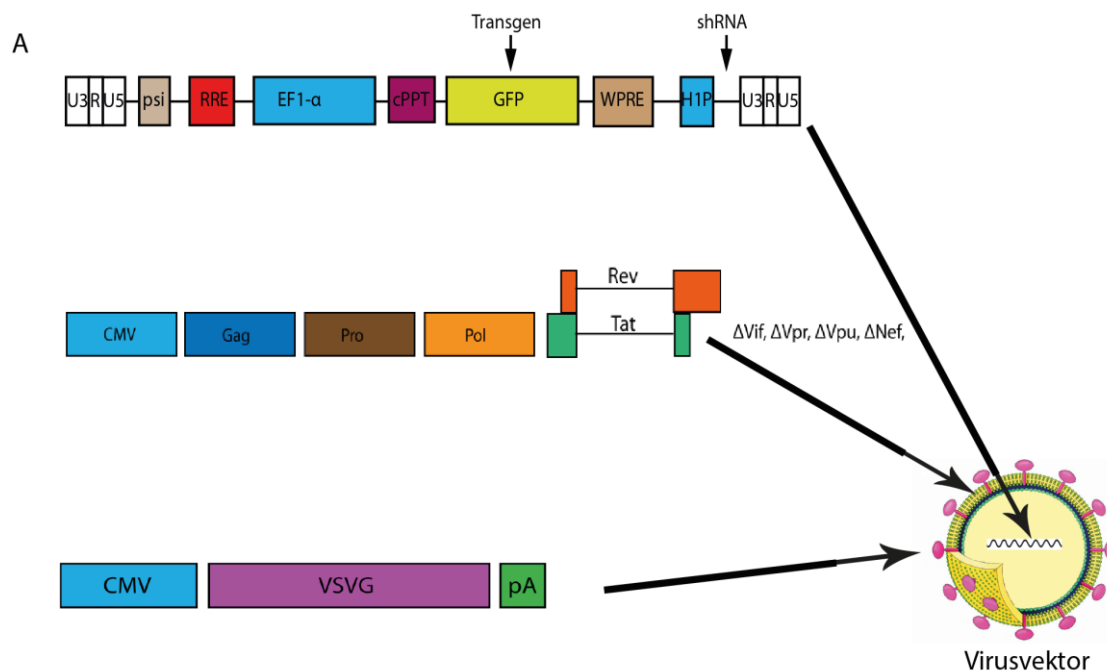
Abbildung 8: Ergebnisse der RNA-Expressionsanalyse von Risp/ Fam21 in Zelllinien und primären Zellen. Mit einer qRT-PCR Reaktion wurden die RNA Mengen von Risp/ Fam21 in **A** verschiedenen Zelllinien und **B** in primären Zellen, bezogen auf das Referenzgen RPII mit der $2^{-\Delta C_p}$ Methode analysiert. Bei den Zelllinien handelt es sich um die Astrozyten Zelllinien 85HG66, U138MG und die persistent infizierte Zelllinie TH4-7-5. Des Weiteren wurden noch eine Monozyten Zelllinie (Thp1), eine T-Zelllinie (Jurkat) und zwei Zelllinien die typischerweise in der HIV Forschung verwendet werden (HEK293T und HeLa) analysiert. Als primäre Zellen wurden PBMCs und Makrophagen (MDM) untersucht. Bei den PBMCs wurde auch noch unterschieden zwischen Zellen die nicht mit PHA stimuliert wurden, welche die mit PHA-stimuliert wurden und PHA-stimulierte PBMCs die dann mit HIV-1_{NL4-3}, infiziert wurden, analysiert. Risp/ Fam21 RNA Level sind in all diesen Zellen messbar und es sind auch Unterschiede zu erkennen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Bei den primären Zellen wurden jeweils die Zellen drei unterschiedlicher Spender untersucht.

3.1.2 Etablierung eines Systems zur Modulation der Risp/ Fam21 Expression

Für weitere Versuche sollte ein System etabliert werden, mit dem die Expression von Risp/ Fam21 oder davon abgeleiteten Sequenzen (im Folgenden als Risp/ Fam21 Sequenzen bezeichnet) moduliert werden kann.

3.1.2.1 Konstrukte zur Modulation der Risp/ Fam21 Expression

Um die Expression von Risp/ Fam21 in schwer zu transfizierenden Zelltypen wie T-Zellen zu modulieren, sollen diese Zellen mit lentiviralen Vektoren transduziert werden. Diese Methode hat zusätzlich den Vorteil, dass eine stabile Modulation der Risp/ Fam21 Expression in diesen Zellen erreicht werden kann. Als lentivirales Vektorsystem wird ein System der zweiten Generation aus dem Labor von Prof. Didier Trono verwendet, das aus drei Plasmiden besteht: pLVTHM, pSPAX2 und pMD2.G (Wiznerowicz and Trono 2003). Der Vektor pLVTHM enthält den EF1alpha Promoter, der die Expression eines Transgenes (wie z.b. GFP oder ein 16.4.1-GFP Fusionsprodukt) reguliert und einen RNA Polymerase III Promoter (H1 Promoter; speziell zur Expression von shRNAs), der eine simultane Expression einer small-hairpin RNA (shRNA) mit demselben Vektor ermöglicht. Flankiert werden diese Sequenzen von der HIV-1 LTR und dem Verpackungssignal Psi, die eine Verpackung der gewünschten RNA Sequenz in die Vektoren und in den Zielzellen schließlich eine Integration in das Wirtsgenom ermöglichen. Das Plasmid pSPAX2 kodiert für alle Strukturkomponenten die für die Produktion von Viruspartikeln nötig sind (mit Ausnahme von env), die viralen Enzyme sowie für die viralen regulatorischen Faktoren Rev und Tat. pMD2.G schließlich kodiert für das Oberflächenglykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSVG), welches die Infektion eines breiten Spektrums an Zellen, aufgrund eines größeren Zelltropismus als HIV, ermöglicht (Abbildung 9). Abbildung 9A zeigt die einzelnen Plasmide, die für die Herstellung der lentiviralen Partikel nötig sind, und dazu eine Übersicht über die kodierenden Elemente die auf den einzelnen Plasmiden vorliegen. In der Tabelle B in Abbildung 9 ist eine Übersicht über die Nomenklatur der klonierten pLVTHM-Konstrukte zu sehen. Konstrukte für die Expression von fünf verschiedene Kombinationen von GFP oder dem 16.4.1-GFP Fusionsprotein und non-silencing shRNA (n.s. shRNA) oder shFam21 wurden hergestellt. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenz für den Knockdown der endogenen Risp/ Fam21 Proteine stammte aus dem Paper von Gomez und Billadeau aus dem Jahr 2009 (Gomez and Billadeau 2009). Die Zielsequenz für die shRNA gegen Risp/ Fam21 liegt in der 3' UTR („Untranslated region“; Region, die nicht mehr in Proteine übersetzt wird) aller bisher bekannten mRNAs, die für funktionelle Risp/ Fam21 Proteine kodieren (Anhang 2).



B

Virusvektornamen	Transgen	shRNA
GFP-n.s.	<i>GFP</i>	Non-silencing shRNA
GFP-shFam	<i>GFP</i>	shRNA gegen Risp/Fam21
16.4.1-GFP	<i>16.4.1-GFP</i>	keine shRNA
16.4.1-GFP-n.s.	<i>16.4.1-GFP</i>	Non-silencing shRNA
16.4.1-GFP-shFam	<i>16.4.1-GFP</i>	shRNA gegen Risp/Fam21

Abbildung 9: Übersicht über das lentivirale Vektorsystem zur Transduktion der Zielzellen und die vorhandenen Konstrukte. **A:** Für die Produktion der lentiviralen Vektoren wird ein Vektorsystem der zweiten Generation bestehend aus drei Plasmiden verwendet. Das erste Plasmid pLVTHM kodiert für das gewünschte Transgen (z.B. GFP) unter der Kontrolle von einem EF1-alpha Promoter und enthält einen zusätzlichen Promoter (H1 Promoter) für die Expression einer shRNA. Flankiert werden diese Regionen 5' und 3' von den HIV Long-Terminal-Repeats (LTR), die für die stabile Integration des Transgens in das Wirtsgenom der Zellen wichtig sind. Das zweite Plasmid kodiert für die HIV Strukturproteine und Enzyme: Gag, Pro und Pol sowie für die regulatorischen Proteine Rev und Tat. PMD2.G schließlich kodiert für das Oberflächenglykoprotein des Vesiculären Stomatitis Virus (VSVG). In der Tabelle in **B** ist aufgezeigt welche Kombinationen von Transgenen (nur GFP oder 16.4.1-GFP) und shRNAs (n.s. shRNA oder shRNA gegen Risp/ Fam21) in den verschiedenen Konstrukten vorliegen und wie die entsprechenden Konstrukte benannt wurden.

Zur Verifizierung der Funktionalität der Konstrukte wurden diese in HeLa-Zellen transfiziert und die Überexpression bzw. den Knockdown der jeweiligen Proteine per Westernblot und qRT-PCR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Bestätigung der Funktionalität des Modulationssystems in persistent infizierten Astrozyten

Um nun zu analysieren, ob die Modulation der Risp/ Fam21 Sequenzen auch einen Einfluss auf die HIV-Replikation besitzt, wurden persistent infizierte Astrozyten (TH4-7-5) mit den lentiviralen Partikeln transduziert und Knockdown und Überexpression der Zielsequenzen wurden per Westernblot und qRT-PCR verifiziert (Abbildung 10). Der Knockdown von den endogenen Risp/ Fam21 Sequenzen ist auf Protein-Ebene (Abbildung 10A) und auf RNA-Ebene (Abbildung 10B) messbar. Ebenso ist die Überexpression von 16.4.1-GFP auch auf Protein-Ebene (Abbildung 10C) und RNA-Ebene (Abbildung 10D) zu sehen.

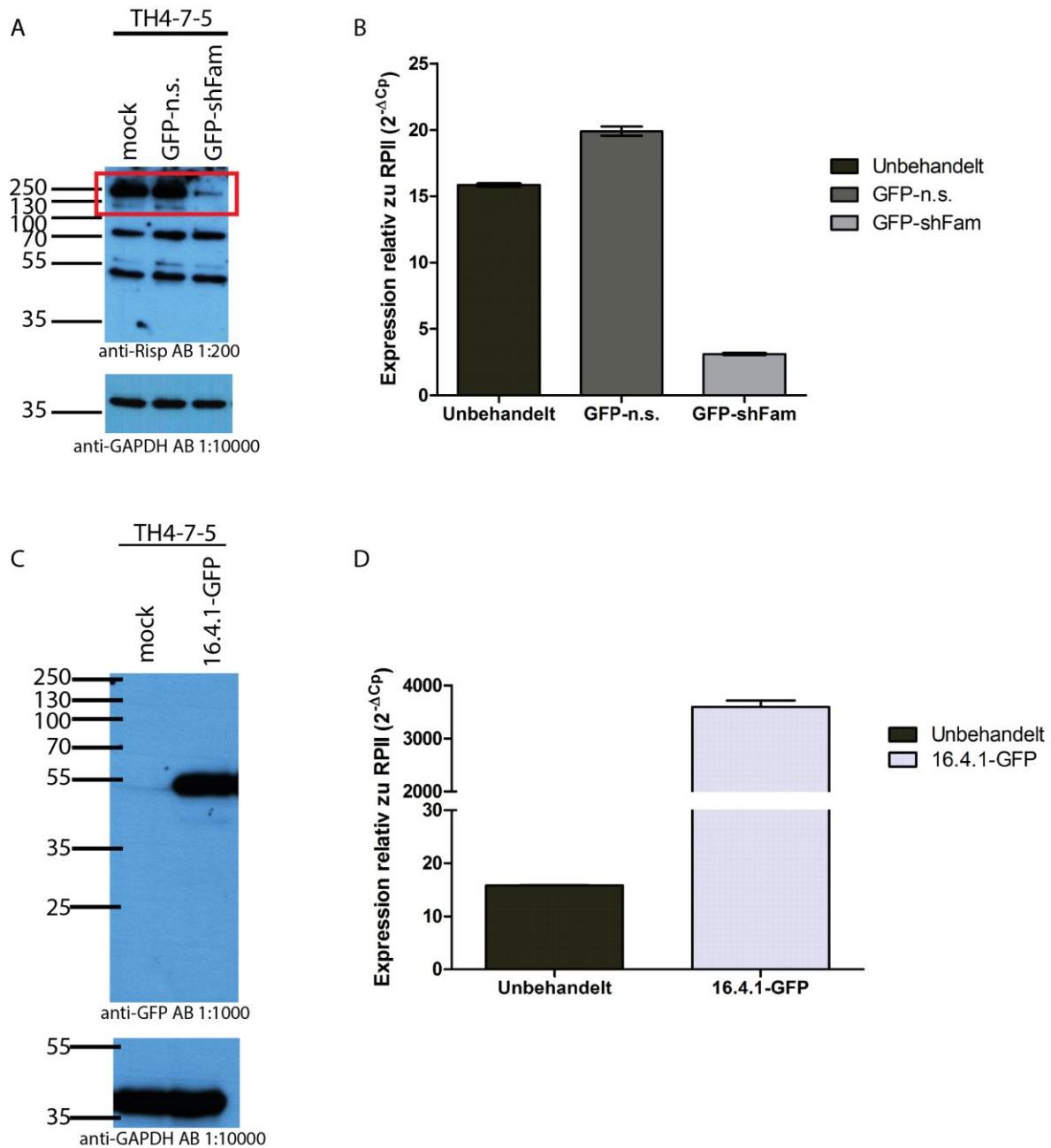


Abbildung 10: Verifizierung der Funktionalität der Vektoren in persistent infizierten Astrozyten (TH4-7-5). TH4-7-5 Zellen wurden mit folgenden Vektor-Konstrukten transduziert und 5 Tage nach Transduktion wurden Proben für Westernblot oder qRT-PCR genommen um die Funktionalität der Vektoren zu testen: GFP-n.s., GFP-shFam und 16.4.1-GFP. **A:** Westernblot zur Verifizierung des Knockdown der endogenen Fam21/Risp Proteine bei Transduktion von shFAM shRNA im Vergleich zu n.s. shRNA. Die obere Hälfte des Westernblots wurde mit den hauseigenen Risp Antikörpern in einer Verdünnung von jeweils 1:200 inkubiert. Der untere Teil des Blots wurde mit einem GAPDH Antikörper inkubiert in einer Verdünnung von 1:10000 und dient als Ladekontrolle. Roter Kasten: endogene, Volllänge Risp/ Fam21 Proteine. Die zusätzlichen Banden konnten nicht identifiziert werden. **B:** Nachweis des Knockdown auch auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR. **C:** Westernblot zum

Nachweis der Überexpression von 16.4.1-GFP in TH4-7-5 Zellen. Der Blot ist zur Verdeutlichung der richtigen Bande mit einem GFP Antikörper gefärbt (1:1000), damit die Bande nicht von den zusätzlichen Banden bei Färbung mit dem Risp Antikörper verdeckt wird. Der untere Teil des Blots zeigt wiederum die GAPDH Ladekontrolle (1:10000). Abbildung **D** zeigt diese Überexpression auf RNA Ebene. Bei den Westernblot-Ergebnissen sind exemplarische Ergebnisse eines Versuchs und bei den RNA-Ergebnissen sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt.

Um zu untersuchen, ob diese Modulation einen Effekt auf die HIV Replikation hat, wurde der Überstand der persistent infizierten TH4-7-5 Zellen mit Hilfe eines ELISAs auf Gag-p24 Gehalt getestet. In Abbildung 11 ist zu sehen, dass auch bei der Transduktion der Zellen mit dem Kontrollvektor, der keine Fam21 Sequenzen enthält (GFP-n.s.), ein Anstieg der p24 Menge zu detektieren ist, was auf die Anwesenheit von Resten des Input-Virusvektors im Zellkulturüberstand hinweist. Jedoch ist auch zu sehen, dass bei der Expression der shRNA gegen Risp/ Fam21 ein signifikanter Unterschied zu den mit ns shRNA transduzierten Zellen nachweisbar war, was wiederum auf einen Anstieg der HIV-Produktion schließen lässt. Ist weniger Risp/ Fam21 in den Zellen vorhanden, ist also die Hemmung der HIV-Replikation vermindert und es kann wieder mehr Virus gebildet werden, was über die Messung des Gag-p24 Gehalts im Überstand von TH4-7-5 Zellen gezeigt werden konnte.

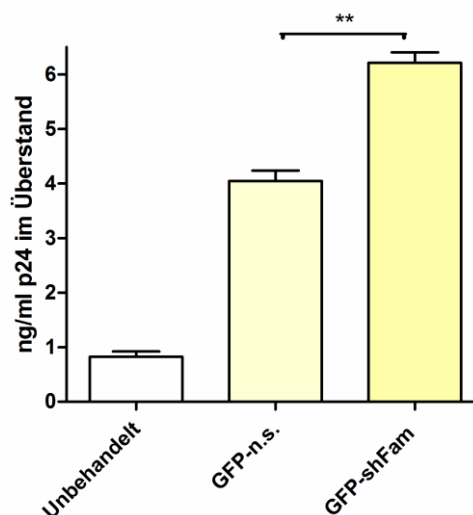


Abbildung 11: Effekt des Risp/ Fam21 Knockdowns auf persistent infizierte Astrozyten (TH4-7-5). Der Effekt von Knockdown der endogenen Risp/ Fam21 Proteine auf die HIV Produktion in den persistent infizierten Astrozyten ist mittels Gag-p24 Analyse der TH4-7-5 Zellkulturüberstandes getestet worden. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Analyse erfolgte mit dem Student's t-Test; $p < 0,0013$.

Diese Analyse diene als „Proof-of-Concept“ dafür, dass durch den Knockdown von Risp/ Fam21 mit lentiviralen Vektoren die HIV Replikation gesteigert werden kann.

3.1.3 Modulation der Risp/ Fam21 Expression in HIV-Zielzellen (T-Zellen)

Mit Hilfe dieses Systems wollte ich nun den Effekt, den die Modulation der Risp/ Fam21 Expression auf die HIV Replikation bzw. Virusproduktion hat, in HIV-Zielzellen, im Genaueren in Jurkat T-Zellen, untersuchen.

3.1.3.1 Knockdown und Überexpression von Risp/ Fam21 in Jurkat T-Zellen

Um das Modulationssystem auf Jurkat T-Zellen zu übertragen, wurden diese Zellen zuerst mit einem lentiviralen Vektor mit steigenden Virusmengen titriert, um zu prüfen, wie gut sich diese Zellen mit unseren lentiviralen Partikeln transduzieren lassen. Abbildung 12A zeigt, dass Virusinokulum mit einem Gag-p24-Gehalt von ca. 200ng pro $5 \cdot 10^5$ Zellen ausreicht, um eine fast 100%ige Transduktionseffizienz zu erreichen. Es ist also festzustellen, dass sich Jurkat Zellen sehr gut mit den VSVG-pseudotypisierten lentiviralen Partikeln transduzieren lassen. Folgend wurde auch überprüft, ob der Knockdown bzw. die Überexpression der Risp/ Fam21 Sequenzen ebenfalls in Jurkat Zellen funktionierte. Dazu wurden wieder RNA-Proben per qRT-PCR analysiert (Abbildung 12B) und Protein-Proben per Westernblot (Daten nicht gezeigt). Auf RNA Ebene ist sowohl der Knockdown der endogenen Risp/ Fam21 Sequenzen als auch die Überexpression von 16.4.1 zu sehen. Per Westernblot ist auch die Überexpression der 16.4.1-GFP Fusionsproteine erkennbar, jedoch sind die endogenen Risp/ Fam21 Proteine aufgrund ihrer geringen Proteinmengen nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt), wodurch der Knockdown nicht auf Proteinebene zu visualisieren war.

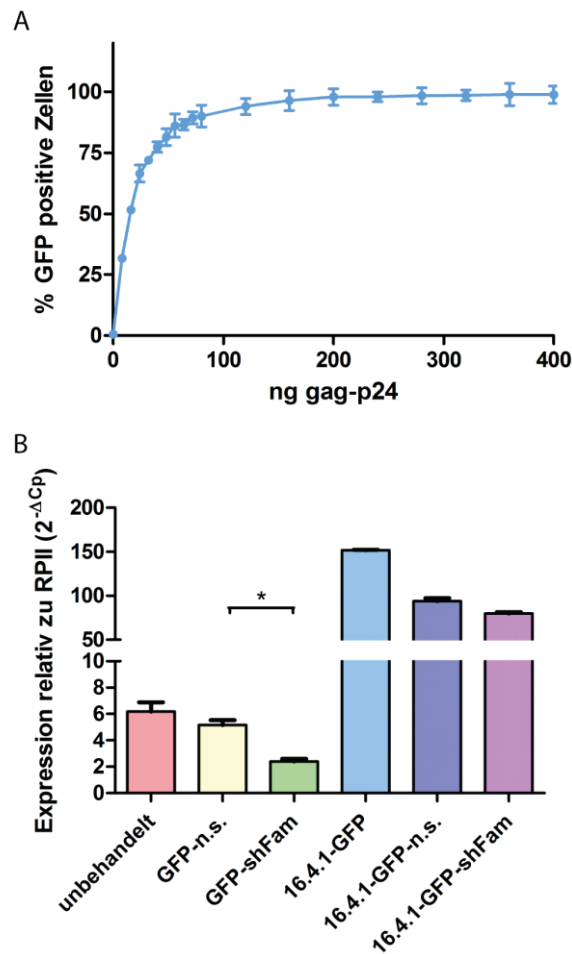


Abbildung 12: Überexpression und Knockdown von Risp/ Fam21 in Jurkat Zellen. Jurkat Zellen wurden mit steigenden Virusmengen (in ng Gag-p24) mit den verschiedenen GFP-enthaltenden lentiviralen Konstrukten transduziert (**A**). Auf RNA Ebene (**B**) ist wiederum Knockdown der endogenen Risp/ Fam21 RNA erkennbar sowie auch die Überexpression von 16.4.1. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten T-Test analysiert ($p=0,01$). Es sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Zusammenfassend konnte auch in diesen Zellen der Knockdown und die Überexpression von Risp/ Fam21 gezeigt werden.

3.1.3.2 Effekt auf die HIV-Replikation bei Modulation der Risp/ Fam21 Expression in T-Zellen

Um zu analysieren, ob diese Modulation einen Effekt auf die HIV-Replikation bzw. auf die Virusproduktion in einer akuten HIV Infektion zeigt, führte ich folgenden Versuch durch: Die Jurkat-Zellen wurden stabil mit den lentiviralen Konstrukten transduziert, mit Transduktionseffizienzen um ca. 80% (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurden die Zellen mit HIV-1_{LA1} infiziert, wobei nach 48h ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, um sicher zu gehen, dass das gesamte Input-Virus entfernt

wurde. Weitere 48h nach Infektion wurde ein Teil der Zellen, sowie Zellkulturüberstand geerntet. Die Zellen wurden fixiert und intrazelluläres Gag-p24 wurde immunhistochemisch angefärbt. Infektöse Viren im Zellkulturüberstand wurden mit LC5-RIC Reporterzellen bestimmt. Diese Ergebnisse wurden an Tag 4, 7 und 11 nach Infektion erhoben und sind in Abbildung 13 dargestellt.

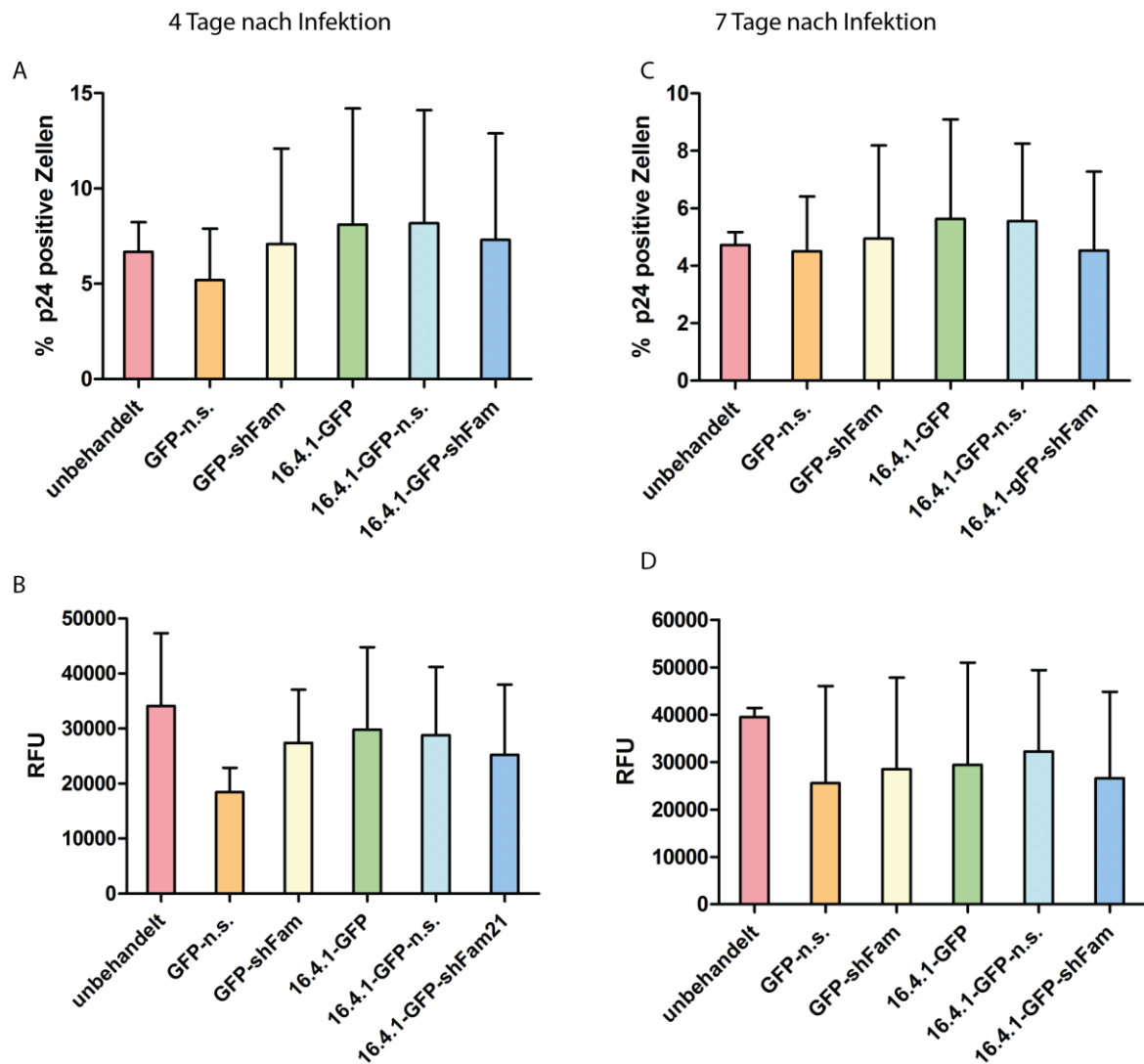


Abbildung 13: Infektion von Jurkat T-Zellen mit modulierter Risp/ Fam21 Sequenz Expression.

Jurkat Zellen, die stabil mit den aufgeführten Konstrukten zur Risp/ Fam21 Modulation transduziert wurden, wurden mit HIV-1_{LAI} infiziert und vier bzw. sieben Tage nach Infektion wurden Zellen für eine intrazelluläres Gag-p24 Färbung (primärer Antikörper anti-Gag-p24; APC-gelabelter sekundärer Antikörper) geerntet (**A + C**). Gleichzeitig wurde auch Zellkulturüberstand geerntet und auf infektöse Viren mit Hilfe von LC5-RIC Reporterzellen überprüft (**B + D**). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. RFU= Relative Fluoreszenz Einheiten

Abbildung 13 zeigt, dass durch die Modulation der Risp/ Fam21 Sequenzen keine Unterschiede in der Anzahl an Zellen mit produktiver HIV-Infektion vier und sieben Tage nach Infektion der Zellen mit HIV-1_{LAI} zu erkennen war (Abbildung 13A+C). Einhergehend mit diesem Ergebnis ist auch zu sehen, dass in allen Ansätzen vergleichbare Mengen an infektiösen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand vorlagen (Abbildung 13B+D).

Auch 11 Tage nach Infektion (Daten nicht gezeigt) änderten sich diese Ergebnisse nicht. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die verschiedenen modulierenden Sequenzen keinen Einfluss auf die HIV-Infektion und Replikation in Jurkat T-Zellen unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen haben.

3.2 Anti-HIV Aktivität von Präparaten und Inhaltsstoffen aus der Arzneipflanze *Cistus incanus* sp (Ci)

Im ersten Teil meiner Doktorarbeit befasste ich mich mit dem Einfluss eines zellulären Faktors, nämlich der Risp/ Fam21 Proteine, auf die HIV-Replikation. Da ich keinen Effekt der Risp/ Fam21 Proteine auf die akute HIV-1 Infektion in T-Zellen feststellen konnte, habe ich mich in dem folgenden Teil damit beschäftigt einen anderen Weg zur Inhibition der HIV-Infektion zu einem früheren Zeitpunkt zu untersuchen. Hierzu analysierte ich die anti-HIV Wirkung von Präparaten aus der Arzneipflanze *Cistus incanus*. Dazu wurde hauptsächlich das EASY-HIT Reporter Assay mit den LC5-RIC Zellen verwendet (Kremb et al. 2010).

3.2.1 Aktivität verschiedener Ci Präparationen und Verstärkung der anti-HIV Aktivität durch Polyphenolanreicherung

Um die anti-HIV Aktivität von Ci zu analysieren, wurden mehrere unterschiedliche, wässrige Präparationen getestet: Cystus052®, ein käuflicher Ci Extrakt der Firma Dr. Pandalis Naturprodukte GmbH, ein von mir selbst hergestellter Extrakt aus getrocknetem Pflanzenmaterial (der normalerweise für die Herstellung von Tee verwendet wird; Cistus Tee) und schließlich noch ein ebenfalls von mir hergestellter Pflanzenextrakt aus frischen Pflanzen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 14 dargestellt. Ich konnte zeigen, dass die drei unterschiedlichen Präparate alle gegen HIV, in diesem Fall HIV-1_{LAI}, wirken und dass auch alle eine, mit vergleichbaren EC₅₀-Werten, ähnlich starke anti-HIV Aktivität aufwiesen. Zusätzlich dazu ist auch noch zu sehen, dass keiner der getesteten Extrakte die Viabilität der LC5-RIC Zellen bei den verwendeten Konzentrationen auf unter 80% eingeschränkt hat.

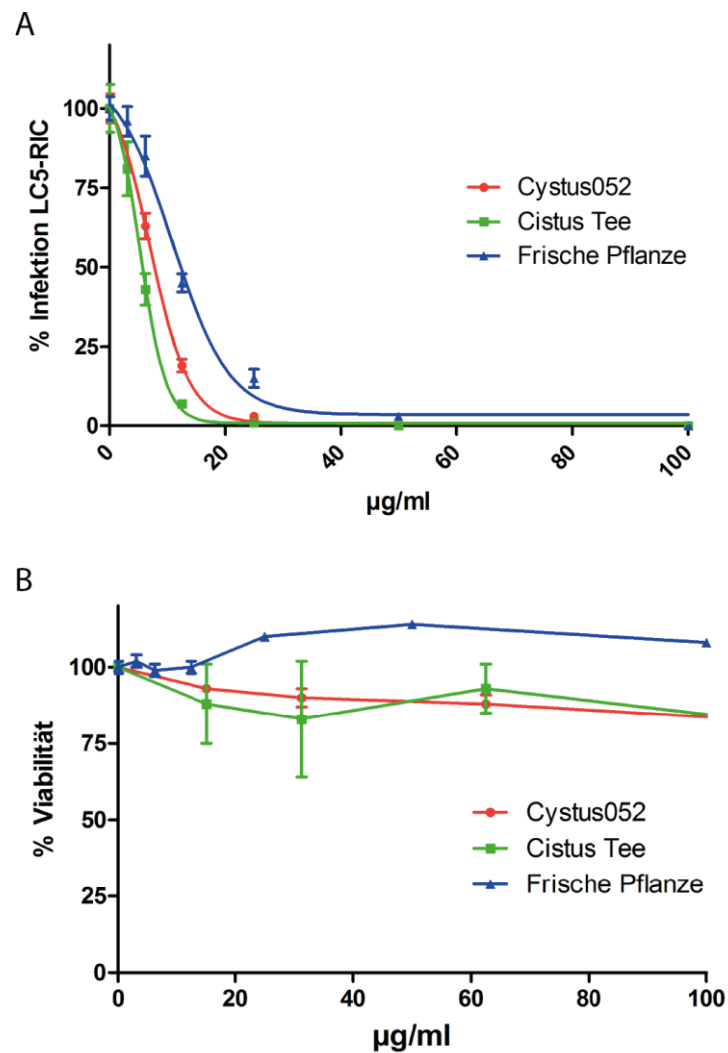


Abbildung 14: Anti-HIV Aktivität verschiedener Cistus-Präparate. **A:** Untersuchung der Aktivität verschiedener Ci-Präparationen: ein käuflich erwerblicher Extrakt (Cystus052®), ein Extrakt der aus getrocknetem Pflanzenmaterial hergestellt wurde (Cistus Tee) und ein Extrakt der aus frischen Pflanzen hergestellt wurde, welche von uns selbst kultiviert wurden (Frische Pflanze). Alle Extrakte wurden mit den LC5-RIC Reporter Zellen im EASY-HIT System getestet und zeigten vergleichbare anti-HIV Aktivitäten. **B:** Ein Viabilitätstest (MTT-Test) der Zellen zeigte keine Reduzierung der Stoffwechselaktivität der LC5-RIC Zellen auf unter 80% bei den eingesetzten Konzentrationen der Extrakte. Die Extrakte wurden in µg Trockenmasse pro ml Zellkulturmedium eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten.

In einem zusätzlichen Versuch die anti-HIV Aktivität zu steigern, wurde eine Anreicherung der polyphenolischen Inhaltsstoffe aus Ci durchgeführt (Abbildung 15).

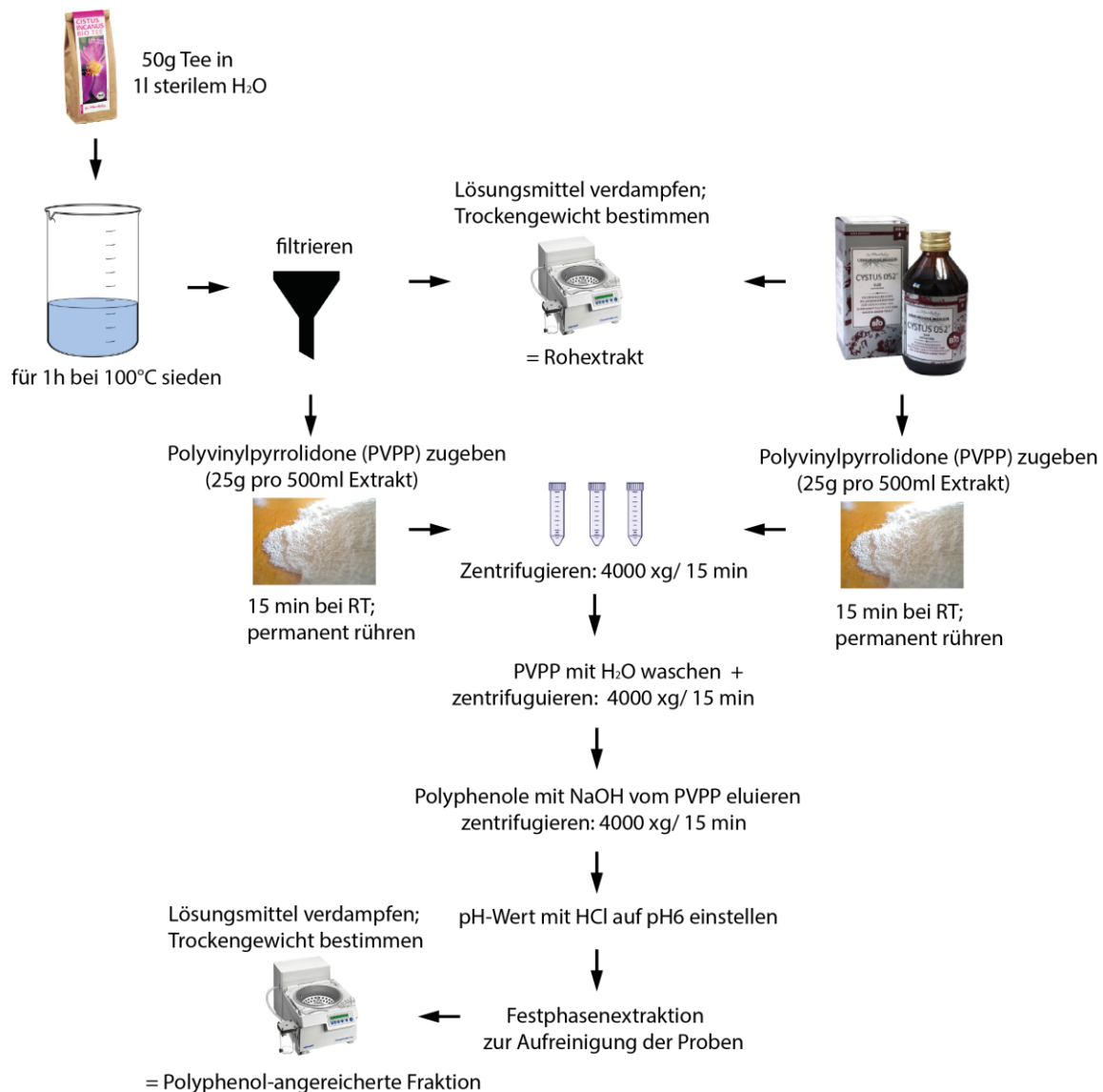


Abbildung 15: Herstellung eines Polyphenol-angereicherten Extraktes. Zur Anreicherung der Polyphenole (PP) aus dem gekauften Sud (Cystus052®) sowie aus dem selbst hergestellten Tee-Sud wurde Polyvenylpyrrolidon (PVPP) verwendet. PVPP wird in der Nahrungsmittelindustrie zur Klärung naturtrüber Getränke (z.B. Bier) genutzt. Polyphenole binden an die PVPP-Partikel, können präzipitiert und anschließend isoliert werden. Gleichmaßen konnte im Zuge dieser Anreicherung für folgende Versuche auch eine Polyphenol-depletierte Fraktion hergestellt werden.

Die Anreicherung der polyphenolischen Bestandteile (PP) des Ci Extraktes konnte mittels PVPP-Fällung aus Ci Tee und Cystus052® durchgeführt werden (Magalhães et al. 2010). Diese angereicherten Extrakte werden im Folgenden mit der Abkürzung CiPP benannt. In folgenden Versuchen wurde die anti-HIV Aktivität der PP angereicherten Fraktion mit der einer PP-depletierten Fraktion verglichen, sowie auch mit der Aktivität der Ci Rohextrakte (Abbildung 16). Die PP-depletierte Fraktion ist ein Nebenprodukt, welches bei der PP-Anreicherung entsteht.

In Abbildung 16A ist zu erkennen, dass die PP-angereicherte Fraktion (rote Linie) eine sehr starke anti-HIV Aktivität aufwies, wobei die PP-depletierte Fraktion (schwarze Linie) im getesteten Bereich keine anti-HIV-Aktivität mehr zeigte. Vergleicht man die inhibitorische Aktivität des Rohextraktes (rote Linie) mit der der PP-angereicherten Fraktion (orange Linie) in Abbildung 16B so lässt sich erkennen, dass die PP Fraktion zusätzlich auch eine stärkere anti-HIV Aktivität besaß als der Rohextrakt. Gezeigt sind nur die Ergebnisse dieser Untersuchung für den gekauften Cystus052® Extrakt, jedoch waren diese Ergebnisse identisch mit denen von dem Extrakt aus dem Teekraut (Daten nicht gezeigt).

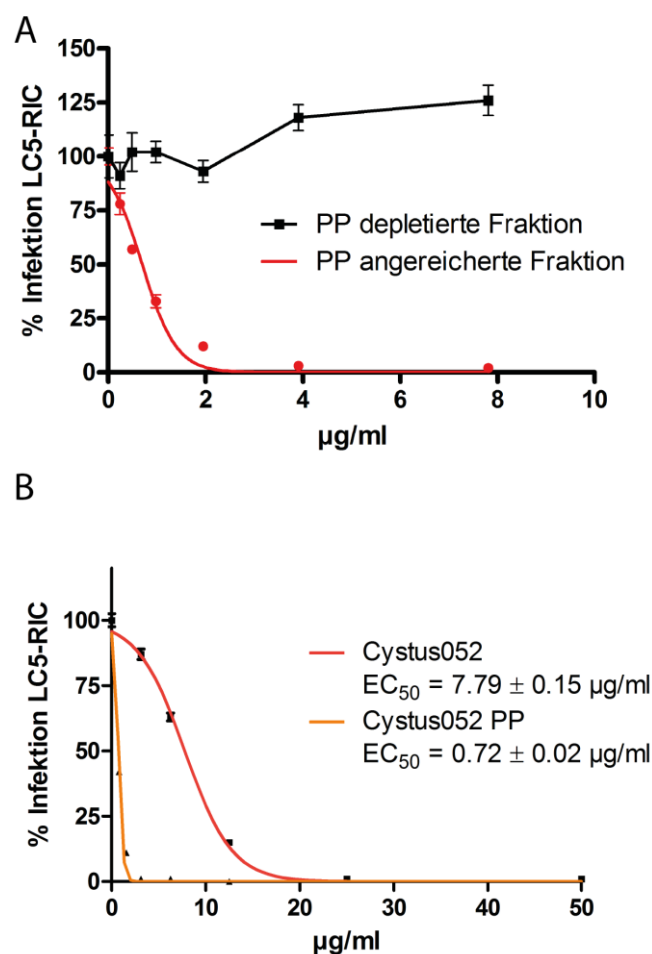


Abbildung 16: Untersuchung der anti-HIV Aktivität von Polyphenol-angereicherten und –depletierten Fraktionen des Cystus052® Extraktes. A: Vergleich der Aktivität der Polyphenol-angereicherten Fraktion (rote Linie) mit der Polyphenol-depletierten Fraktion (schwarze Linie): die PP-depletierte Fraktion zeigte keine anti-HIV Aktivität mehr, die PP-angereicherte Fraktion jedoch starke anti-HIV Aktivität. **B:** Beim Vergleich der anti-HIV Aktivität der PP-angereicherten Fraktion und dem Roh-extrakt, zeigte die PP-angereicherten Fraktion eine bis zu 10-fach höhere Aktivität. Die

Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment.

3.2.2 Wirkung von Ci Extrakten gegen HI-Viren mit unterschiedlichen Tropismen

Nach der Untersuchung der verschiedenen Ci Extrakte, habe ich die Aktivität von Ci gegen unterschiedliche HIV-Laborstämme untersucht. Dazu wurden zuerst sowohl CXCR4- als auch CCR5-trope Laborisolate getestet. Zur Einfachheit sind immer nur die Ergebnisse für die Untersuchung mit dem Cystus052® Sud (Ci) und der PP angereicherten Fraktion von Cystus052® (CiPP) gezeigt.

Abbildung 17 zeigt die anti-HIV Aktivität von Ci (Abbildung 17A) und CiPP (Abbildung 17B) gegen ein Virus mit dem Corezeptor-Tropismus für CXCR4 (X4-trop), HIV-1_{LAI} (orange Linie), und ein CCR5-tropes (R5-trop) Virus, HIV-1_{AD8} (rote Linie). Wie zu sehen ist, hatten sowohl die Rohextrakte (Abbildung 17A) Aktivität gegen Viren beider Corezeptor-Tropismen, als auch die PP-angereicherten Fraktionen (Abbildung 17B).

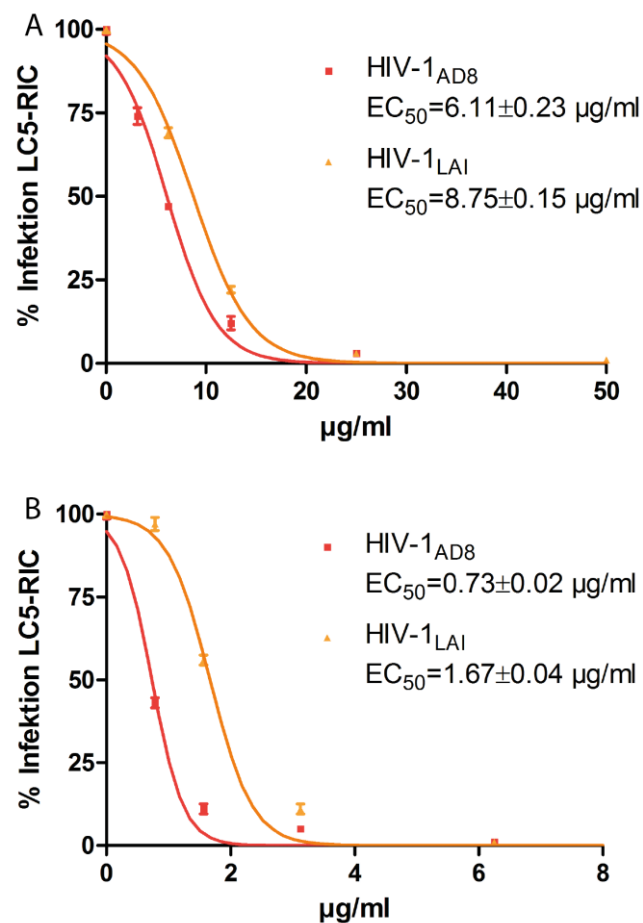


Abbildung 17: Anti-HIV-Aktivität von Cystus052® und Cystus052® PP gegen X4- und R5-trope Viren.

Die Aktivität von Cystus052® (A) und CiPP (B) wurden gegen ein R5-tropes Virus HIV-1_{AD8} (rote Linie) und gegen ein X4-tropes Virus HIV-1_{LAI} (orange Linie) in dem EASY-HIT Reporter Assay getestet. **A:** Cystus052® zeigt ähnliche Aktivität gegen das X4- und das R5-trope Virus. **B:** Die PP-angereicherten Fraktionen zeigten stärkere anti-HIV-Aktivität als die roh-Fraktionen, und es war eine vergleichbare Aktivität gegen HIV-1_{LAI} sowie auch HIV-1_{AD8} zu erkennen. Die Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment.

3.2.3 Wirkung von Ci Extrakten gegen aus Patienten isolierte HIV-Stämme

Bis zu diesem Punkt wurde die anti-HIV Aktivität von Ci nur gegen HIV-Laborstämme getestet. Deswegen wurden in den folgenden Versuchen aus Patienten isolierte Viren verwendet, um die anti-HIV Aktivität von Ci zu testen. Diese Viren erhielten wir von Prof. Dr. Lutz Gürtler, der diese Viren aus HIV-Patienten aus Afrika und auch Deutschland isoliert hat. Abbildung 18 zeigt die Aktivität von Ci (A) und CiPP (B) gegen mehrere HIV-Patientenisolate: HIV-1M_{MVP899-97} (Orange), HIV-1O_{MVP5180-91} (Grün), HIV-2_{MVP10668-93} (Blau) und HIV-1_{V13-03413B} (Violett). Zusätzlich sind zum Vergleich nochmal die Ergebnisse für die Ci/ CiPP Aktivität gegen HIV-1M_{LAI} aufgeführt. Es ist festzustellen, dass Ci bzw. CiPP nicht nur gegen HIV-1 Stämme der Haupt-HIV-Gruppe HIV-1M aktiv war, sondern auch gegen Viren der HIV-1O Gruppe, einer kleinen Außenseitergruppe sowie auch gegen HIV-2. Des Weiteren zeigte Ci bzw. CiPP auch Aktivität gegen ein multiresistentes, primäres Virusisolat (HIV-1_{V13-03413B}).

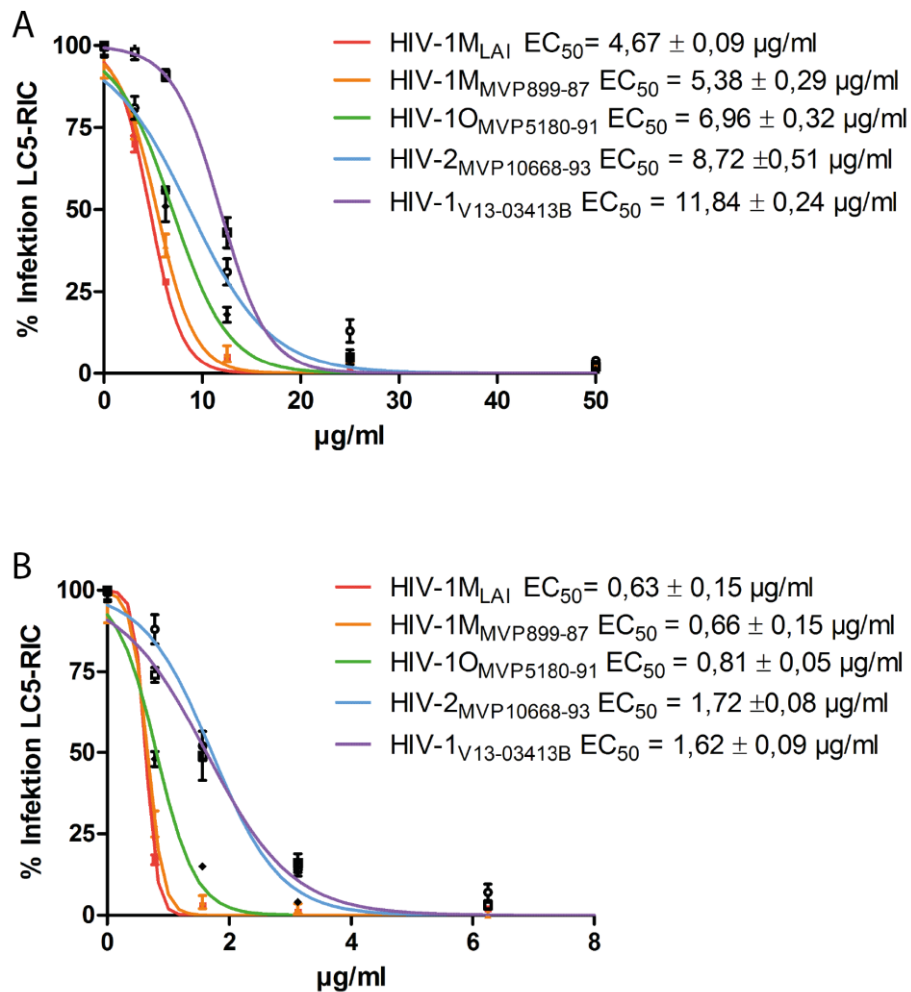


Abbildung 18: Anti-HIV-Aktivität von Cystus052® und Cystus052® PP gegen aus Patienten isolierte HIV Stämme. Unter den aus Patienten-isolierten HIV Stämmen war ein HIV-1M Stamm (HIV-1M_{MVP899-97}), ein HIV-1O Stamm (HIV-1O_{MVP5180-91}), ein HIV-2 Stamm (HIV-2_{MVP10668-93}) und ein multiresistenter HIV-1 Stamm (HIV-1_{V13-03413B}). Es ist zu sehen, dass sowohl der rohe Cystus052® Extrakt (**A**) als auch der mit PP-angereicherte Extrakt (**B**) starke anti-HIV Aktivität gegen die getesteten HIV-Isolate zeigten. Die Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment.

Um zu verifizieren, dass die Wirkung von Ci auch primäre humane HIV-Zielzellen vor einer Infektion schützen kann, wurden Infektionsversuche mit PBMCs durchgeführt. In Abbildung 19 ist zu sehen, dass die anti-HIV Aktivität von Ci (**A**) sowie der PP-angereicherten Fraktion (**B**) auch in PBMCs nachgewiesen werden konnte – sowohl für den HIV-Laborstamm HIV-1_{LAI}, als auch das Patientenisolat HIV-1O_{MVP5180-91}.

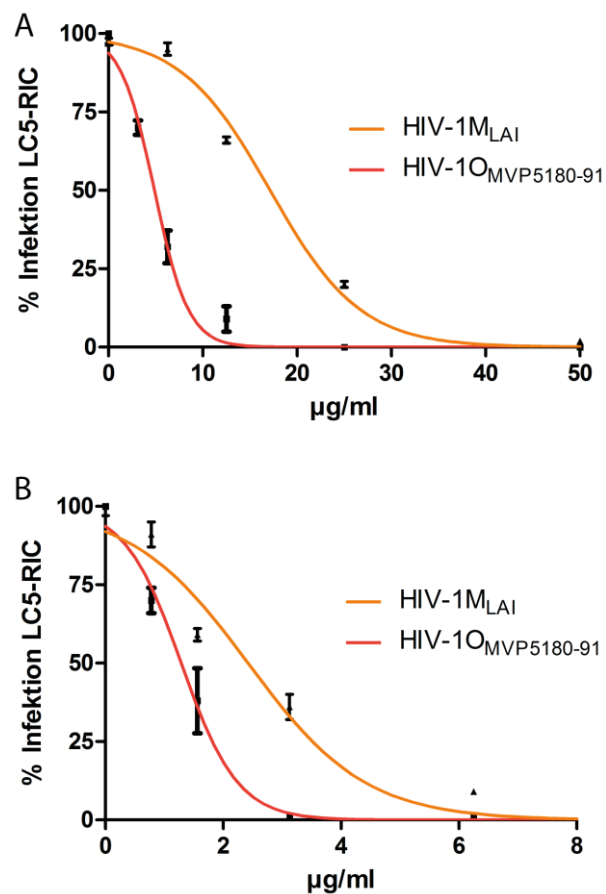


Abbildung 19: Aktivität von Cystus052® in primären Zellen. PBMCs wurden mit dem jeweiligen Virus (HIV-1M_{LAI} – Orange und HIV-1O_{MVP5180-91} – Rot) und mit Ci (A) bzw. CiPP (B) inkubiert. Zwei Tage nach Viruszugabe wurde Überstand auf LC5-RIC Zellen übertragen und wiederum nach drei Tagen wurde die Infektion via Rotfluoreszenz gemessen. Die Versuche wurden mit insgesamt drei unterschiedlichen Spendern durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment mit einem Spender.

3.2.4 Untersuchung des Wirkmechanismus von Ci

Ich konnte bisher zeigen, dass Präparationen, die aus unterschiedlichen Rohstoffen auf unterschiedliche Methoden hergestellt und prozessiert wurden, alle eine potente anti-HIV-Aktivität besitzen. Ebenso, dass man die Aktivität steigern kann, wenn man die polyphenolischen Bestandteile anreichert. Ich beobachtete, dass sich die Wirkung nicht nur auf Laborstämme beschränkte, sondern auch HIV-Patientenisolate inhibiert werden konnten und dass die Wirkung auch primäre humane Zellen vor Infektion schützt. Im Nachfolgenden sollte untersucht werden, welchen Schritt im HIV-Replikationszyklus die Ci Extrakte inhibieren.

3.2.4.1 „Time-of-Addition“ Assay zur Eingrenzung des Wirkzeitpunkts

Mit Hilfe eines Time-of-Addition Assays ist es möglich, den Zeitraum einzugrenzen, an dem die Ci Extrakte ihre Wirkung verlieren und somit Rückschlüsse zu ziehen auf den Schritt im HIV-Replikationszyklus, der durch Ci inhibiert wird (Kremb et al. 2010, Daelemans et al. 2011). Bei dem Assay werden die Inhibitoren der HIV-Replikation zeitgleich mit - und zu bestimmten Zeitpunkten nach - der Viruszugabe hinzugefügt. Ein Eintrittsinhibitor beispielsweise zeigt keine Aktivität mehr, wenn er z.B. sechs Stunden nach Infektion der Zellen zugegeben wird, da im EASY-HIT System der virale Eintritt in die Zielzelle zu diesem Zeitpunkt bereits stattgefunden hat. Gibt man aber einen Proteaseinhibitor zum gleichen Zeitpunkt zu, wird dieser sehr wohl noch seine inhibitorische Aktivität ausüben können, da die Reifung der Viren erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden wird. Für jede Inhibitorklasse können also spezifische, zeitabhängige Verläufe ihrer Aktivität erstellt werden und somit kann eine Einordnung eines Inhibitors mit unbekannter Wirkweise in den HIV-Replikationszyklus vorgenommen werden.

Abbildung 20A zeigt die Ergebnisse des Time-of-Addition Assays. Bei diesem Versuch wurde Ci gemeinsam mit den Referenzsubstanzen T-20 und Efavirenz analysiert. Der Fusionsinhibitor T-20 zeigte schon sehr früh nach der Viruszugabe keine Aktivität mehr, wohingegen der Reverse Transkriptase-Inhibitor Efavirenz seine Aktivität noch länger ausüben konnte. Das Aktivitätsprofil von Ci zeigte schon sehr früh, noch vor dem Fusionsinhibitor T-20, eine Reduzierung der Inhibition. Dies lässt darauf schließen, dass ein sehr früher Schritt im HIV-Replikationszyklus inhibiert wurde. Wenn dies der Fall ist, sollte kein Eintritt der HIV-Partikel in die Zellen stattfinden, und keine HIV-RNA sollte in den Zellen zu finden sein. Dies wurde mit Hilfe einer qRT-PCR in LC5-CD4 Zellen untersucht, die mit Ci bzw. CiPP und HIV inkubiert wurden. In Abbildung 20B wurden die Ergebnisse dazu dargestellt. Es ist zu sehen, dass bei Anwesenheit von Ci oder CiPP, wenn die Zellen mit HIV gemeinsam inkubiert wurden, keine Viruspartikel in die Zellen gelangt sind und deswegen keine HIV-RNA in den Zellen nachweisbar war.

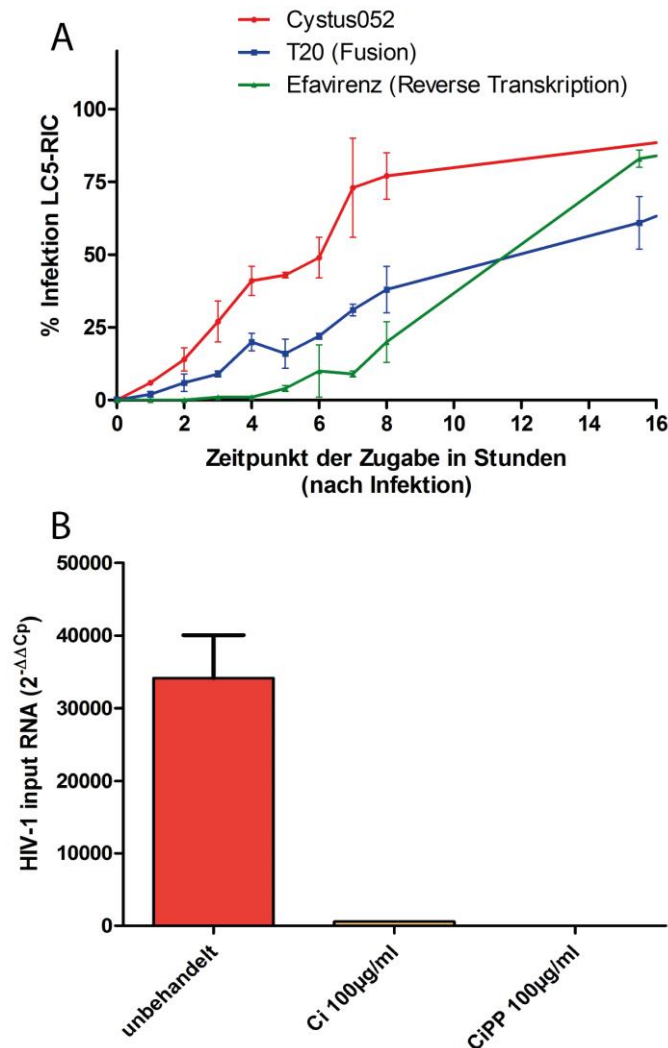


Abbildung 20: Time-of-addition Assay und HIV-RNA Analyse. **A:** Zur Eingrenzung des Wirkmechanismus von Ci wurde ein Time-of-Addition Assay durchgeführt, bei dem die inhibierende Substanz entweder zeitgleich oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (=Zeitpunkt 0) zugegeben wurde. Ci inhibiert einen sehr frühen Schritt im HIV-Replikationsmechanismus, noch vor dem Fusionsinhibitor T-20. **B:** Die qRT-PCR Analyse wurde vier Stunden nach Viruszugabe durchgeführt. Als Referenzen wurde RPII verwendet und zur Analyse wurde mit die $2^{-\Delta\Delta C_p}$ Methode verwendet. Die Anwesenheit von Ci/ CiPP führt zu einer starken Verminderung der intrazellulären HIV RNA Mengen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte eines Experiments in A und die Mittelwerte aus drei Experimenten in B.

3.2.4.2 Attachment Assay

Da in dem Time-of-Addition Assay zu erkennen war, dass Ci sehr früh im HIV-Replikationszyklus wirkt, sogar vermutlich vor der Fusion von Viruspartikel mit Zielzelle, wurde ein Attachment Assay durchgeführt. Bei diesem Assay wird die Anheftung von Viruspartikel an die Zellen (Attachment)

untersucht. Dazu wurden GFP-enthaltende HIV-Partikel hergestellt (HIV-1_{NL4-3-Gag-iGFP}), und dann für vier Stunden mit Ci oder CiPP und den Zellen (LC5-RIC) inkubiert und anschließend mehrfach gründlich gewaschen. In Abbildung 21A sind exemplarische Bilder der Versuchsansätze zu sehen. Man kann bei der Infektionskontrolle sehr gut die Vielzahl der grünen Punkte (respektive Viruspartikel) auf den Zelloberflächen erkennen. Im Gegensatz dazu sind auf den Zellen bei den Ansätzen mit Ci oder CiPP kaum noch grüne Viruspartikel zu finden. Die Anzahl der gebundenen Viren pro Zelle wurde quantifiziert und die Ergebnisse sind in Abbildung 21B dargestellt. Sie zeigen, dass anstatt der ca. 20 GFP Spots pro Zelle (Infektionskontrolle) bei den Ci oder CiPP Ansätzen ca. nur noch 2-3 Spots pro Zelle detektierbar waren. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass in Anwesenheit von Ci Viruspartikel nicht an die Zielzelle binden.

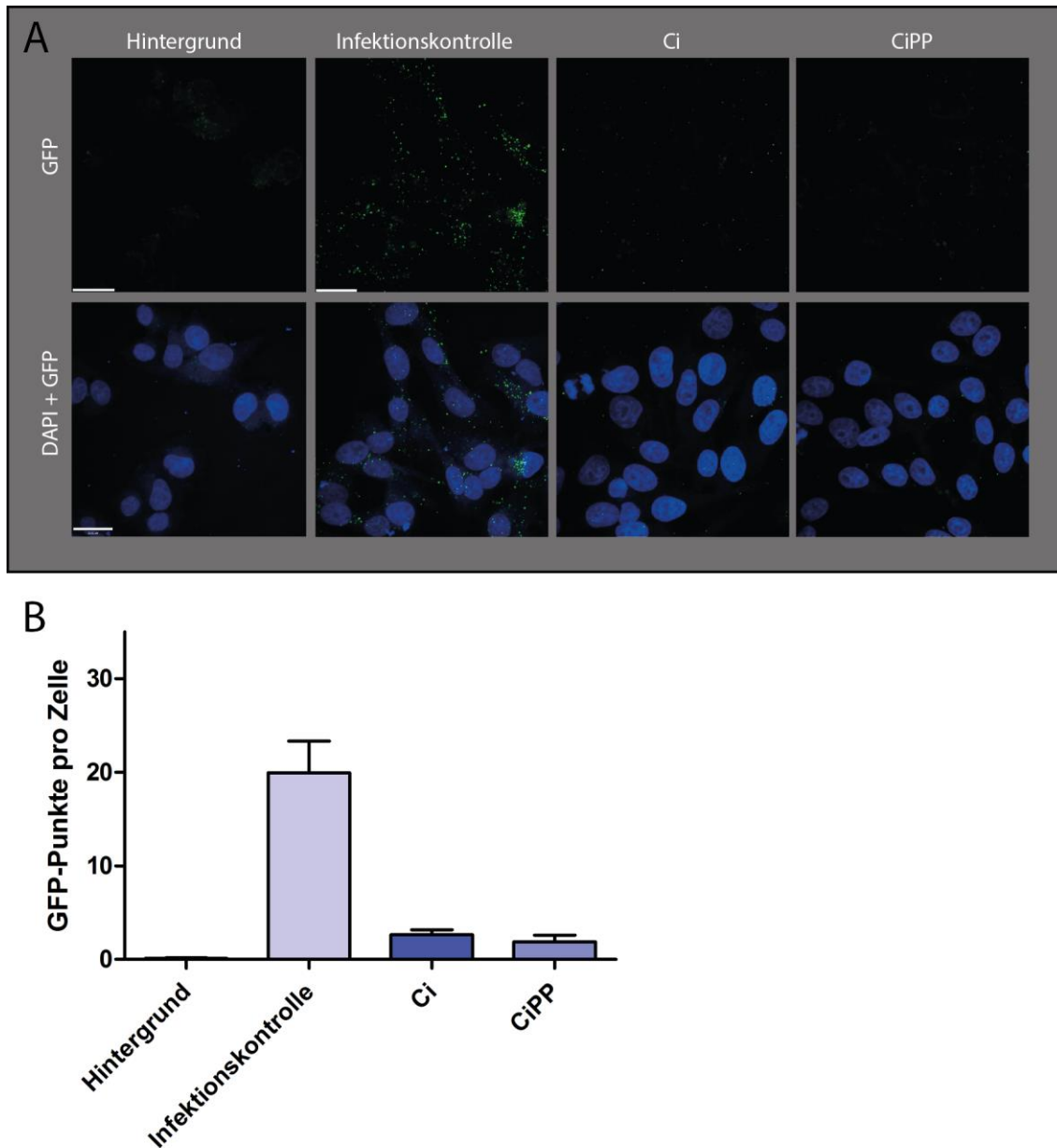


Abbildung 21: Attachment Assay. A: Übereinandergelegte Z-Stapel von LC5-RIC Zellen (DAPI; Blau), die mit GFP-markiertem HIV-1 Viruspartikel inkubiert wurden (GFP; Grün). Dargestellt sind jeweils die Kanäle GFP (oben) und Merge DAPI/GFP (unten). Hintergrund = unbehandelte Zellen; kein HIV. Infektionskontrolle = Zellen + Virus. Ci und CiPP = Zellen + Virus + Ci resp. CiPP. Aufgenommen wurden jeweils Stapel über ca. 10 μ M. Während bei der Infektionskontrolle viele grüne Spots (=Viruspartikel) vorhanden sind, fehlen diese vollständig bei Hintergrund und nahezu vollständig bei Ci und CiPP. **B:** Quantitative Auswertung der Spots/Zelle. Es wurden jeweils ca. 60 Zellen ausgewertet und gezeigt ist jeweils der Mittelwert.

3.2.4.3 Präinkubationsexperiment und Isolierung von intakten Viruspartikeln mittels magnetischer Microbeads

Nachdem ich zeigen konnte, dass Ci die Bindung der Viruspartikel an die Zielzellen verhindert, sollte die Frage geklärt werden, ob die HIV-inhibierende Aktivität von Ci auf der Interaktion von Ci-Inhaltsstoffen mit den Zellen oder den Viruspartikeln beruht. Dazu wurde zuerst ein Präinkubationsexperiment durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden die Zellen für drei Stunden mit Ci inkubiert, gewaschen und schließlich mit HIV versetzt, um zu klären, ob Inhaltsstoffe an die Zellen binden. In einem weiteren Ansatz wurden die Viruspartikel direkt mit Ci inkubiert bevor sie zu den Zellen gegeben wurden und in einem dritten Ansatz wurden Ci und Virus zeitgleich zu den Zellen gegeben (Abbildung 22).

Wie zu sehen ist, zeigte Ci keine Aktivität mehr, wenn es mit den Zellen vorinkubiert wurde (schwarze Linie). Inkubierte man jedoch die Viren mit Ci, konnte man sogar noch einen Anstieg in der Aktivität erkennen, verglichen mit der zeitgleichen Zugabe von Ci und Virus. Somit wurde nachgewiesen, dass Ci direkt mit den Viren interagiert, um die Anheftung der Viren an die Zellen zu verhindern, und nicht mit den Zellen.

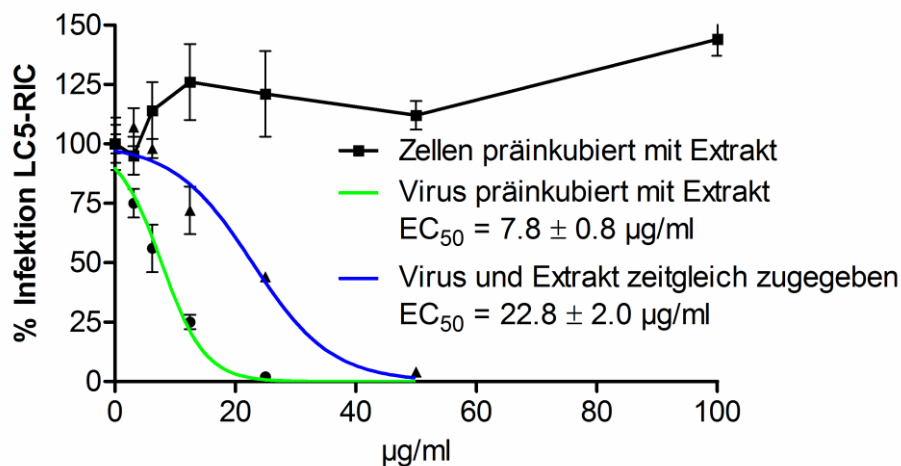


Abbildung 22: Analyse der Vorinkubation von Zellen mit Ci bzw. Virus mit Ci. Schwarze Linie: LC5-RIC Zellen wurden für drei Stunden mit Ci inkubiert, gewaschen und schließlich mit Virus versetzt. Grüne Linie: Virus wurde drei Stunden mit Ci inkubiert, bevor es zu den Zellen gegeben wurde. Blaue Linie: Ci und Virus wurden zeitgleich zu den Zellen gegeben. Während bei Vorinkubation mit - und Abnahme von Ci vor Viruszugabe keine Wirkung mehr zu sehen ist, inhibiert Ci die Infektion sogar stärker bei Vorinkubation mit dem Virus als bei zeitgleicher Zugabe. Die Versuche wurden jeweils in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Viruspartikel durch die Interaktion mit Ci lysiert wurden, oder ob die Viruspartikel durch die Bindung von Ci an die Virusoberfläche intakt bleiben, aber inaktiviert werden und somit nicht mehr an die Zielzelle anheften konnten. Dazu wurde ein Test durchgeführt, bei dem untersucht wurde, ob die Ci-Behandlung die Isolation intakter Viruspartikel stört. Mit den eingesetzten anti-CD44 Microbeads können nur Viren isoliert werden, die noch ihre Hülle mit den darin enthaltenen CD44-Oberflächenproteinen besitzen, also folglich noch intakt sind. Ein Schema über die Versuchsdurchführung ist in Abbildung 23 zu sehen.

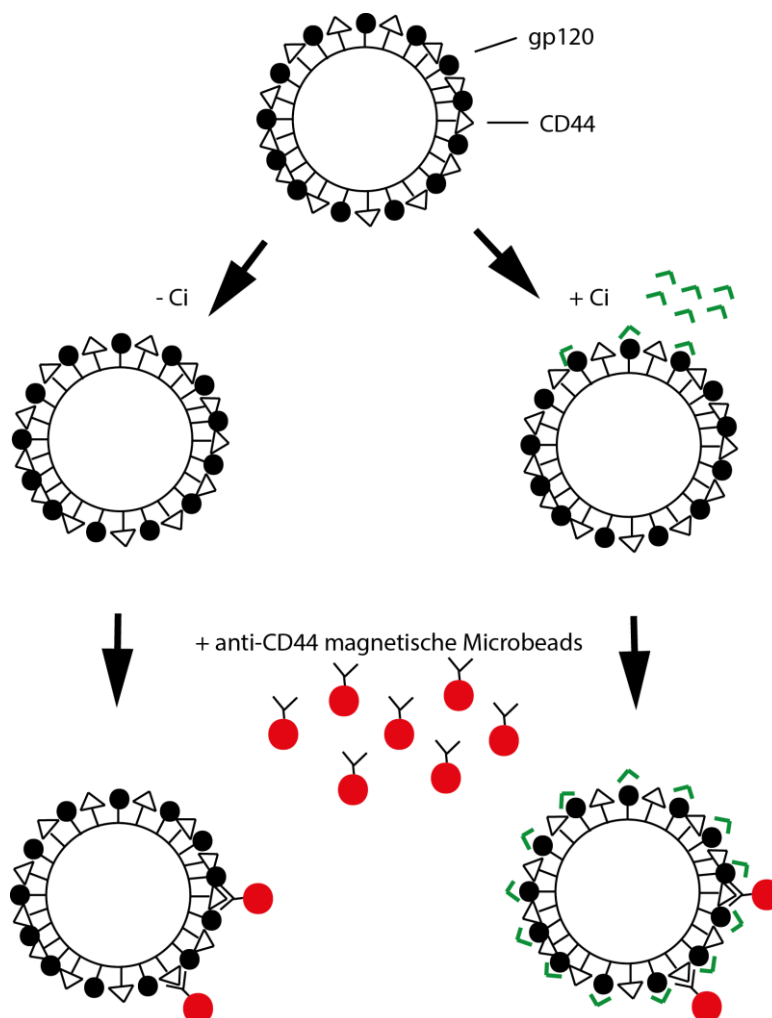


Abbildung 23: Schematische Übersicht über die Virusisolation mittels magnetischer Microbeads.

Für diesen Versuch wurden Viruspartikel hergestellt, die auf ihrer Oberfläche das zelluläre CD44-Protein tragen. Dieses Protein tragen Viren auf ihrer Zelloberfläche, sobald sie z.B. in HeLa-Abkömmlingen hergestellt werden. Nach Inkubation der Viruspartikel mit Cistus (+Ci); (Kontrolle: Virus der nicht mit Ci inkubiert wurde (-Ci)) wurden anti-CD44 magnetische Microbeads zugegeben, welche dann über CD44 an die Viruspartikel binden konnten. Isolierung der intakten Viruspartikel erfolgte mittels eines Magnetfeldes.

Für den Versuch wurden Viren hergestellt, die das humane CD44-Protein auf ihrer Oberfläche tragen, damit sie über diesen an die magnetischen anti-CD44 Microbeads gebunden werden konnten. Für die Herstellung dieser Viren wurden LC5-Zellen verwendet. LC5-Zellen besitzen dieses Protein nativ auf ihrer Zelloberfläche und somit ist das CD44-Oberflächenprotein auch auf Viren zu finden, die in diesen Zellen hergestellt wurden (Lawn et al. 2000, Phillips et al. 2012). Identische Mengen dieser Viren wurden einerseits für eine Stunde mit Ci (+Ci) inkubiert und andererseits als Kontrolle ohne Ci (-Ci). Beide Proben wurden in einem Magnetfeld auf Säulen geladen, gewaschen und nach Entfernung des Magnetfeldes eluiert. Der initiale Durchfluss, die Waschfraktion und das Eluat wurden gesammelt. Der Gehalt an Virus in allen Fraktionen wurden mittels Gag-p24 ELISA ermittelt (Abbildung 24A) und die Infektiosität aller Fraktionen mit LC5-RIC Zellen untersucht (Abbildung 24B). In Abbildung 24A ist zu sehen, dass bei beiden Ansätzen (-Ci und +Ci) gleiche Mengen an intakten Viruspartikeln eluiert werden konnten. Für Abbildung 24B wurden die gesammelten Fraktionen auf LC5-RIC Zellen gegeben, um die Infektiosität der isolierten Viren zu überprüfen. Die Fraktion, die mit Ci inkubiert wurde, wies eine deutlich verringerte Infektiosität auf. Somit lässt sich feststellen, dass Ci weder die Menge an intakten Viruspartikeln reduzierte, noch die Bindung der anti-CD44-Microbeads an das CD44-Oberflächenprotein gehemmt hat. Jedoch wurde die Infektiosität der Viruspartikel reduziert, wobei diese dabei aber nicht lysiert wurden, sondern nach der Inkubation mit Ci noch intakt waren.

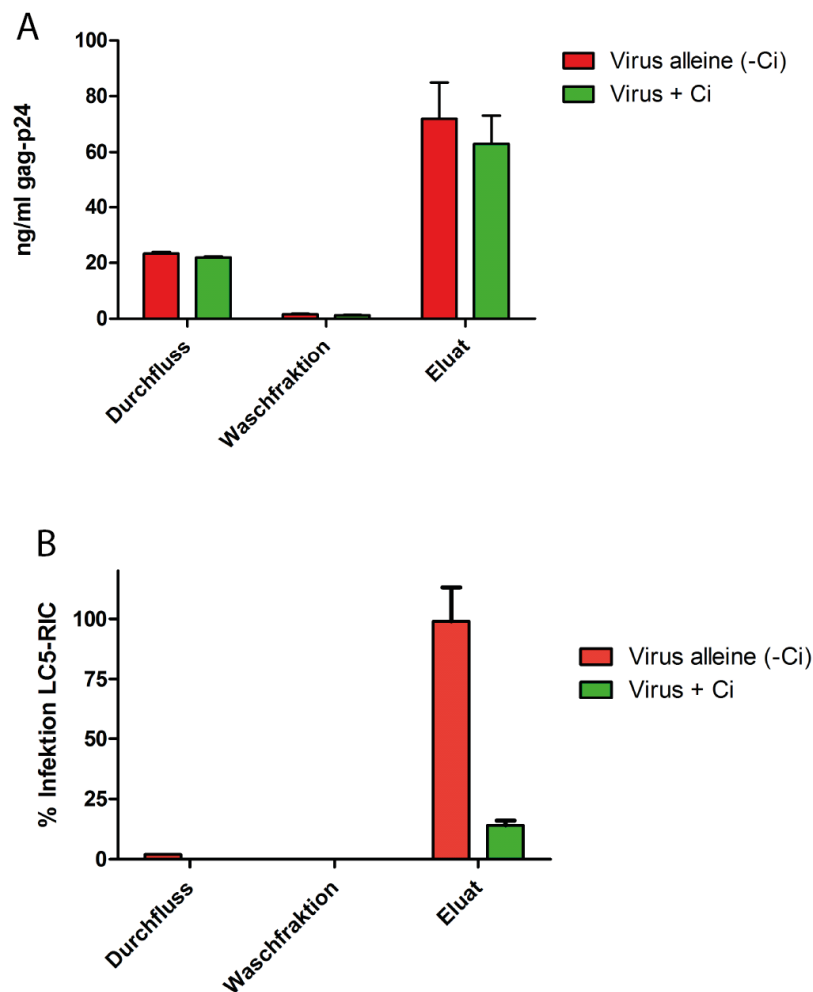


Abbildung 24: Analyse der isolierten Viruspartikel. A: Untersuchung der isolierten Viruspartikel mit Hilfe eines Gag-p24 ELISA zur Quantifizierung der Gag-p24 Mengen in den einzelnen Ansätzen (Virus alleine – rot; Virus und Ci – grün) für alle untersuchten Fraktionen (Durchfluss, Waschfraktion und Eluat). Die Abbildung zeigt, dass bei beiden Ansätzen vergleichbare Mengen an Gag-p24 in den eluierten Virusfraktionen vorlagen. **B:** Analyse der isolierten Fraktionen beider Ansätze auf Infektiosität mit LC5-RIC Zellen. Die mit Ci-inkubierte, eluierte Virusfraktion zeigte eine deutliche Reduktion der Infektiosität. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte eines Experiments.

3.2.5 „Bioassay-guided“ Fraktionierung von Ci zur Aufklärung der aktiven Inhaltsstoffe

Bisherige Versuche wurden immer mit dem kompletten Rohextrakt oder dem PP-angereicherten Extrakt durchgeführt. Nun sollte versucht werden die aktiven Substanzen aus dem Extrakt herauszufiltern. Hintergrund hierzu ist die Frage, ob Einzelsubstanzen aus Ci nach der Fraktionierung des Rohextraktes immer noch anti-HIV-Aktivität zeigen. Dazu wurde der Cystus052® Extrakt an die

Firma Bicol GmbH weitergegeben. In Abbildung 25 ist eine Übersicht über die einzelnen aufeinanderfolgenden Fraktionierungsschritte zu sehen.

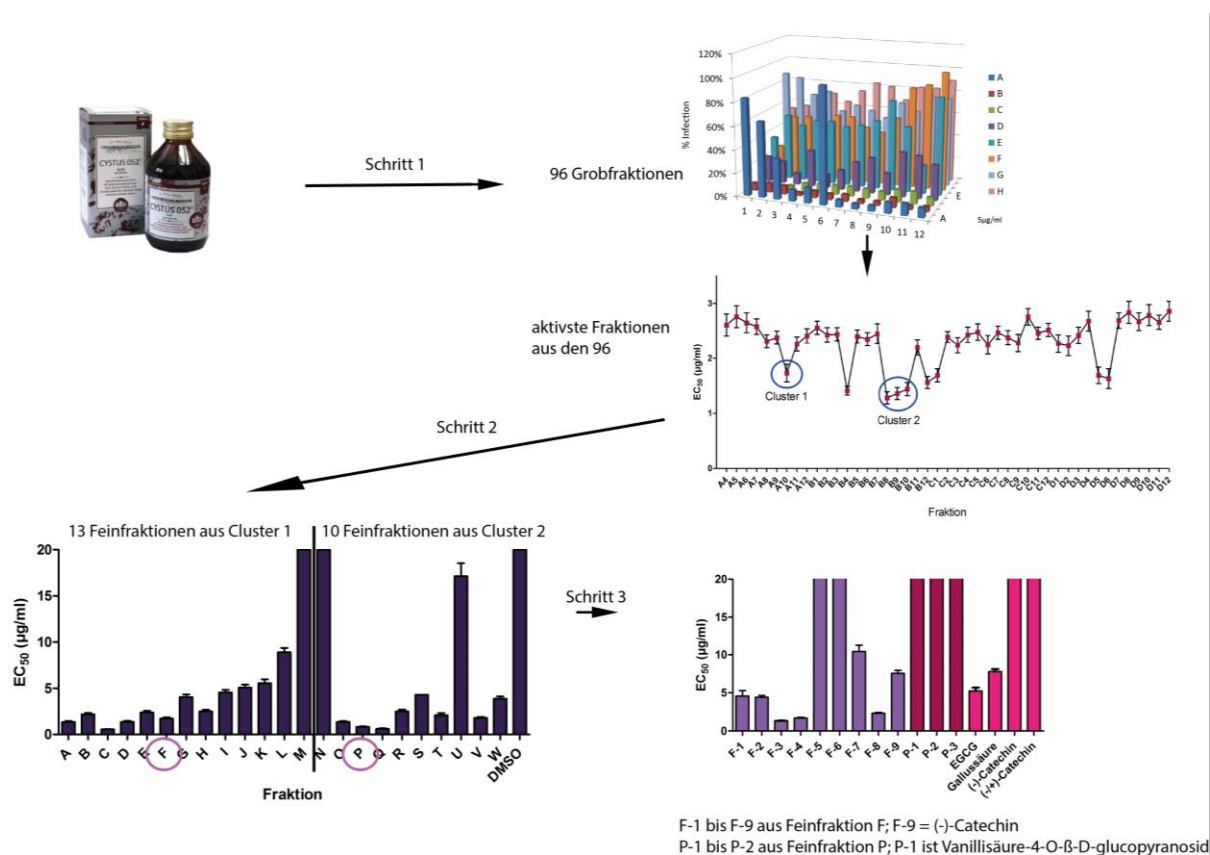


Abbildung 25: Schematische Übersicht über die einzelnen Schritte der „Bioassay-guided fractionation“ von Cystus052®. Der Cystus052® Sud wurde von der Firma Bicol mittels deren Fraktionierungsverfahren BIFRAC N in 96 Fraktionen aufgetrennt. Diese 96 Fraktionen wurden von uns getestet und von den aktivsten Fraktionen wurden die EC₅₀-Werte bestimmt. Bei dieser EC₅₀-Bestimmung nach Schritt 1 wurden mehrere höher aktive Substanzen identifiziert (EC₅₀ < 2), von welchen zwei Cluster ausgewählt wurden für eine weiterfolgende Analyse. Diese zwei Cluster wurden in Schritt 2 noch weiter aufgetrennt in 13, respektive 10 Feinfraktionen. Diese Feinfraktionen wurden wieder von uns im EASY-HIT System auf Aktivität gegen HIV getestet und es konnten dabei wieder mehrere hoch-aktive Feinfraktionen gefunden werden. Zwei dieser Feinfraktionen (mit lila Kreisen gekennzeichnet) wurden schließlich in ihre Reinstoffe zerlegt, wobei neun Reinstoffe in Fraktion F zu finden waren (F-1 bis F-9) und drei Reinstoffe in Fraktion P (P-1 bis P-3). Diese Reinstoffe wurden wieder im EASY-HIT System, zusammen mit vier Referenzsubstanzen, getestet.

Der erste Schritt der Fraktionierung beinhaltete die Auftrennung des Cystus052® Rohextraktes in 96 Fraktionen von Seitens der Firma Bicol nach deren proprietären Verfahren BIFRAC N. Diese erste Fraktionierung lieferte Fraktionen, die noch aus einer Vielzahl an einzelnen Substanzen bestanden. Diese Fraktionen stellten somit Cluster an Reinstoffen dar. Diese Grobfractionen wurden von uns in

dem EASY-HIT Assay zu Konzentrationen von 5 µg/ml Trockenmasse getestet und dabei zeigten einige Fraktionen eine stärkere Aktivität als andere (Daten nicht gezeigt). Von diesen aktiveren Fraktionen wurden dann Verdünnungsreihen erstellt und getestet, um die EC₅₀-Werte dieser Fraktionen bestimmen zu können (Abbildung 26). Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, gab es auch hier wieder einige Fraktionen, die eine stärkere Aktivität als die anderen aufwiesen, mit EC₅₀-Werten kleiner als 2 µg/ml.

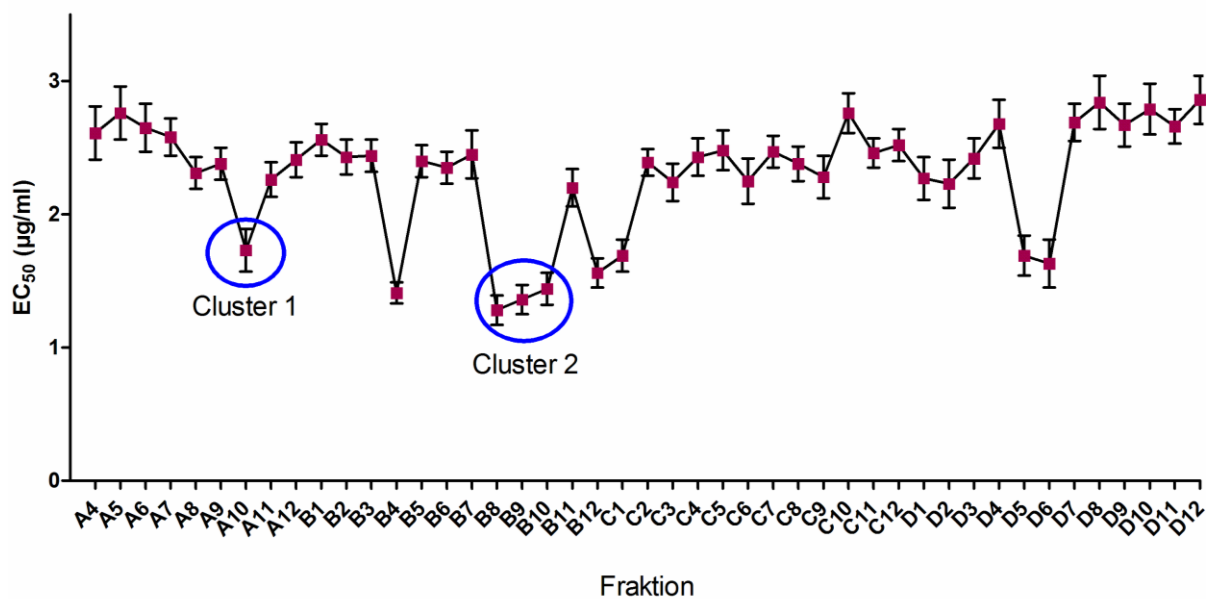


Abbildung 26: Quantifizierung der anti-HIV Aktivität von den aktivsten Grobfraktionen aus dem ersten Auftrennschritt. 45 der aktivsten Grobfraktionen wurden in Verdünnungsreihen getestet um deren EC₅₀-Werte bestimmen zu können (EC₅₀ in µg Trockenmasse pro ml Zellkulturmedium). Es waren fünf Cluster an stärker aktiven Fraktionen zu erkennen (EC₅₀ < 2 µg/ml), wobei zwei der Cluster für die weitere Analyse ausgewählt wurden. Diese sind mit den blauen Kreisen gekennzeichnet. Gezeigt sind die Mittelwerte aus Triplikaten.

Zwei dieser stärker aktiven Cluster, gekennzeichnet mit den blauen Kreisen, wurden aufgrund einer Empfehlung der Firma ausgewählt und schließlich durch Bicolll noch weiter aufgetrennt. Wir erhielten insgesamt 23 weitere höher aufgelöste Feinfraktionen mit - laut Angabe der Firma - 1-3 Reinstoffen pro Fraktion (Abbildung 27). Auch hier ist wieder zu erkennen, dass es nach der starken Auftrennung der einzelnen Fraktionen, immer noch mehrere hochaktive Feinfraktionen gibt, die für eine weitere Aufschlüsselung von Interesse sind.

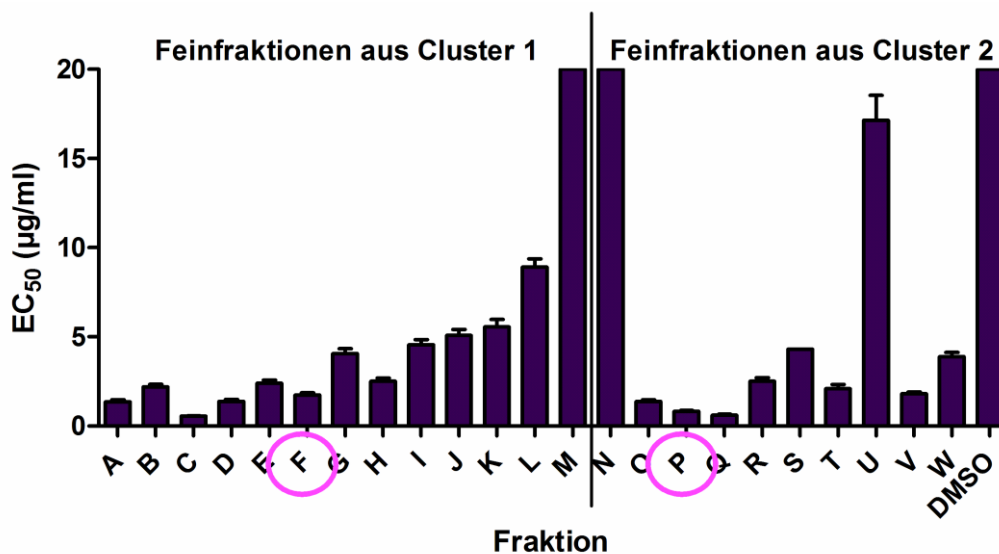


Abbildung 27: Analyse der anti-HIV Aktivität nach der Auftrennung von Cluster 1 und Cluster 2. Cluster 1 und Cluster 2 wurden in insgesamt 23 hochaufgelöste Fraktionen aufgetrennt, und die anti-HIV-Aktivität der Feinfraktionen mit dem EASY-HIT Assay analysiert (EC₅₀; µg Trockenmasse pro ml Zellkulturmedium). Zwei Fraktionen (F und P, in Pink gekennzeichnet) wurden für die Auftrennung in Reinstoffe verwendet. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte eines Experiments.

Zwei von diesen Feinfraktionen wurden schließlich noch weiter aufgetrennt in ihre Reinstoffe (Abbildung 28).

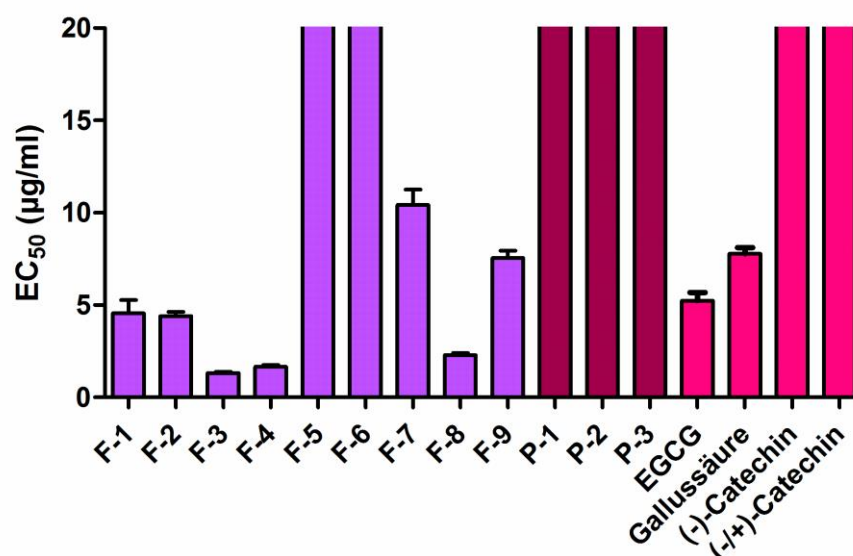


Abbildung 28: Bestimmung der anti-HIV-Aktivität der Reinstoffe aus den hochaufgelösten Fraktionen F und P. Dargestellt sind die EC₅₀-Werte (in µg Trockenmasse pro ml Zellkulturmedium) der Stoffe F-1 bis F-9 aus Fraktion F und P-1 bis P-3 aus der Fraktion P. Zusätzlich zu den Reinstoffen wurden noch verschiedene käuflich erwerbliche Substanzen getestet: EGCG = Epigallocatechingallat, Gallussäure, (-)-Catechin und (+/-)-Catechin (alle von Sigma). Die Versuche wurden jeweils in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und gezeigt sind die Mittelwerte aus einem Experiment.

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass die bereits hochaufgelösten Fraktionen F und P in mehrere Reinstoffe aufgespalten werden konnten. Bei den getesteten Reinstoffen stammen F-1 bis F-9 aus der F-Fraktion und P-1 bis P-3 aus der P-Fraktion. Für zwei der Reinstoffe wurde zu diesem Zeitpunkt schon eine Strukturaufklärung durchgeführt, wobei Stoff F-9 als (-)-Catechin und P-1 als Vanilliinsäure-4-O-β-D-glucopyranosid identifiziert wurde. Die Reinstoffe F-1, F-2, F-3, F-4 und F-8 zeigten stärkere anti-HIV Aktivität mit niedrigeren EC₅₀-Werten und stellen somit die interessanteren Substanzen dar. Zum Vergleich wurden noch weitere Substanzen mitgetestet: Epigallocatechingallat (EGCG), Gallussäure, (-)-Catechin und (+/-)-Catechin (alle von Sigma). Von diesen zeigten nur Epigallocatechingallat und Gallussäure anti-HIV-Aktivität im getesteten Bereich. Es lässt sich also feststellen, dass die Fraktionierung des sehr komplexen Rohextraktes möglich war und dass einzelne Reinstoffe aus Cystus052® isoliert werden konnten, die auch nach Vereinzelung noch anti-HIV Aktivität zeigten.

4 Diskussion

In dieser Arbeit habe ich zwei neue Ansätze zur Inhibition von HIV, insbesondere im Hinblick auf ihr Potential für neue, antivirale Strategien untersucht. Die Suche nach weiteren Möglichkeiten die HIV Infektion zu inhibieren, ist und bleibt ein wichtiger Aspekt bei der Bekämpfung von HIV aufgrund der schnellen Resistenzbildung der Viren, der hohen Kosten und der teils starken Nebenwirkungen der derzeitig eingesetzten Medikamente und der Tatsache, dass die bisherige antiretrovirale Therapie keine komplette Inhibition der Virusproduktion erreichen kann.

Der erste Ansatz beinhaltete die mögliche Nutzung von zelleigenen HIV-Inhibitoren zur Hemmung der HIV-Expression am Beispiel der Risp/ Fam21 Proteine. Für diese Proteine wurde gezeigt, dass sie einen inhibitorischen Effekt auf Rev Aktivität und HIV-1 Replikation in einer persistent HIV-infizierten Astrozytenzelllinie (TH4-7-5) besitzen (Vincendeau et al. 2010). Deswegen wurde in dieser Arbeit das Potential dieser Proteine, HIV auch in anderen Zelltypen zu inhibieren, untersucht.

Im zweiten Ansatz ging es darum, ob medizinische Pflanzen als Quelle für anti-HIV Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen dienen können. Als Beispiel hierzu wurde die Pflanze *Cistus incanus* wegen ihres hohen Polyphenolgehalts untersucht. Diese Pflanze zeigte anti-HIV Aktivität gegen ein breites Spektrum an Labor- und primären HIV-Stämmen mit einem neuen Wirkmechanismus als Anheftungsinhibitor. Gleichzeitig diente diese Pflanze auch zur Identifizierung von neuen Reinstoffen mit anti-HIV Aktivität.

4.1 Untersuchung des Einflusses der zellulären HIV-1 Inhibitorfamilie Risp/ Fam21 auf die HIV-1 Replikation

Zelluläre HIV Inhibitoren sind momentan stark im Fokus der HIV-Forschung. Die zellulären Inhibitoren können die HIV Replikation auf den unterschiedlichsten Wegen inhibieren, wobei es bisher noch nicht viele Möglichkeiten für die post-transkriptionelle Inhibition der HIV-Replikation gibt. Ein Beispiel dafür sind die Risp/ Fam21 Proteine, die durch deren Interaktion mit HIV-1 Rev identifiziert wurden (Kramer-Hämmerle et al. 2005, Vincendeau et al. 2010). Die bisherigen Untersuchungen zur anti-HIV Aktivität von Risp/ Fam21 beschränkten sich auf persistent infizierte Astrozyten. Zur Untersuchung der Tatsache, ob Risp/ Fam21 auch in anderen Zellen eine Rolle spielen könnte, analysierte ich, ob es in anderen Zellen auch exprimiert wird.

4.1.1 Nachweis der Expression von Risp/ Fam21 RNA-Transkripten in Zelllinien und primären Zellen

Die Expressionsanalyse (Abbildung 8A) zeigte, dass in allen Zellen die getestet wurden, Expression von Risp/ Fam21 RNA zu sehen war. Zusätzlich war auch zu beobachten, dass mit einer stärkeren Expression von Risp/ Fam21 RNA in den Astrozytenzelllinien, Unterschiede in den Expressionsstärken deutlich wurden. Die höheren Mengen an Risp/ Fam21 in den Astrozyten, verglichen mit den anderen getesteten Zellen, könnten ein Grund für die reprimierte Virusproduktion in diesen Zellen darstellen. In dem von M. Vincendeau beschriebenen Modell der HIV-Inhibition durch Risp/ Fam21 in Astrozyten, gehen die Risp/ Fam21 Proteine im Zytoplasma der Wirtszelle eine Interaktion mit HIV-Rev ein, wodurch dieses nicht mehr zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln kann um den Export von einfach- oder ungespleißten mRNAs zu vermitteln (Vincendeau et al. 2010). Dadurch können diese RNAs nicht in Proteine translatiert werden und Virusproduktion kann nicht stattfinden.

Auch in primären Zellen (Abbildung 8B) ist Risp/ Fam21 RNA Expression zu erkennen, wobei hier vor allem die Tatsache auffällt, dass die Stimulation der PBMCs durch PHA zu einer Reduktion der Risp/ Fam21 Expression führt. Die Zellen werden typischerweise mit PHA stimuliert, um die T-Zellen zu aktivieren und somit die Infektionsrate mit HIV zu erhöhen. Aufgrund unserer Ergebnisse mit der Risp/ Fam21 Expressionsanalyse konnte ich die Hypothese entwickeln, dass die Expression von Risp/ Fam21 in CD4⁺ Zielzellen durch Zellaktivierung beeinflusst werden kann. Ob dies einen Einfluss auf die Infizierbarkeit von primären Zellen hat, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Dazu könnte das von mir etablierte System, oder, wie später erwähnt wird, ein Adeno-assoziiertes System zur Modulation der Risp/ Fam21 Expression verwendet werden.

4.1.2 Etablierung eines Systems zur Modulation der Risp/ Fam21 Proteine

Für die Untersuchung des Effekts, den die Modulation der Risp/ Fam21 Expression auf primäre HIV-Zielzellen ausübt, sollte ein lentivirales Vektorsystem etabliert werden. Grundsätzlich kann mit einem solchen System eine gute Transduktionseffizienz in vielen verschiedenen Zellen erzielt werden und gleichzeitig hat es auch noch den Vorteil, dass eine stabile Transduktion der Zellen möglich ist. Die Modulation der Risp/ Fam21 konnte auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 10). Des Weiteren führte der mit diesem System bewirkte Knockdown von Risp/ Fam21 zur Zunahme der Produktion von HIV Strukturproteinen in persistent infizierten Astrozyten (Abbildung 11) in Anlehnung an bisher gesammelte Ergebnisse (Vincendeau et al. 2010). Jedoch wurde bei der bisherigen Untersuchung von M. Vincendeau die Modulation der Risp/ Fam21 Proteine über transfizieren von siRNAs oder Plasmiden mit Risp/ Fam21 Sequenzen erreicht. Der

Vorteil von dem von mir etablierten System ist die Tatsache, dass mit lentiviraler Transduktion schon ein Schritt in Richtung dauerhafte Modulation der Risp/ Fam21 Expression erreicht wurde, was auch im Hinblick auf therapeutische Maßnahmen wie Gentherapie von Interesse ist. Jedoch konnte auch bei der Kontrolle (Transduktion der Zellen mit Viruspartikel die eine n.s. shRNA enthalten) ein Anstieg der extrazellulären Gag-p24 Mengen beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass überschüssige Viruspartikel des Input-Virus an die Oberfläche der Zielzellen gebunden haben und diese nach und nach wieder in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Der einzige Weg diese Viren zu entfernen ist durch Kultivieren der Zellen über mehrere Passagen (Blömer et al. 2004, Pan et al. 2007). Nichtsdestotrotz ist ein signifikanter Anstieg der Gag-p24 Mengen bei Knockdown der Risp/ Fam21 Proteine zu erkennen im Vergleich zur Transduktion mit einem n.s. shRNA-Vektor, was auf eine verstärkte Virusproduktion hindeutet. Somit konnte also nachgewiesen werden, dass dieses System grundsätzlich geeignet ist, die Effekte der Modulation der Risp/ Fam21 Expression auf die HIV-Produktion zu analysieren. Jedoch ist die Tatsache, dass es sich bei dem Transduktionssystem um dieselbe Virusfamilie wie HIV handelt, ein Nachteil beim Nachweis der Effekte. Deshalb wäre es geschickter ein Transduktionssystem zu verwenden, das keine Verwandtschaft mit HIV aufweist. In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich ein Adeno-assoziiertes Virussystem für Transduktionszwecke etabliert. Mit diesem System ist es gelungen, die Effekte, die die Risp/ Fam21 Modulation auf die HIV-Produktion hat, verlässlich und ohne störende Einflüsse in Gehirnzellen nachzuweisen.

4.1.3 Effekte der Modulation der Risp/ Fam21 Expression auf die HIV Replikation in HIV-Zielzellen (T-Zellen)

Mit Hilfe des etablierten Systems wurden Jurkat Zellen transduziert und die Funktionalität des Knock-downs und der Überexpression konnte auch in diesen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 12).

Schließlich folgte die Untersuchung, ob die Modulation von Risp/ Fam21, oder davon abgeleiteten Sequenzen, einen Einfluss auf die HIV Replikation hat. Vier, sieben (Abbildung 13), und elf Tage (Daten nicht gezeigt) nach HIV-1_{LAI} Infektion, wurden die Zellen und ebenso Zellkulturüberstand geerntet und analysiert. Dabei war an keinem der Zeitpunkte ein Unterschied in der Anzahl an Zellen mit einer produktiven HIV Infektion sowie auch kein Unterschied in der Produktion von infektiösen Viren zu verzeichnen. Aus diesen Ergebnissen ist also zu schließen, dass die Modulation der getesteten Risp/ Fam21 Sequenzen keinen Einfluss auf die HIV Replikation in akut infizierten Jurkat

Zellen ausübt. Dazu wäre allerdings noch eine Untersuchung der Effekte dieser Modulation in primären humanen CD4+ T-Zellen von großem Interesse

Denkbar wäre die Möglichkeit, dass in Jurkat Zellen die 16.4.1-Sequenz zur Modulation nicht ausreichend ist, und deswegen eine vollständige Risp/ Fam21 Sequenz getestet werden sollte. Dazu müsste analysiert werden, ob die Sequenz für eine Volllänge Risp/ Fam21, welches um die 4000 Basen lang ist, in den pLVTHM-Vektor eingebracht werden kann und schließlich noch eine effiziente Produktion der lentiviralen Partikel stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit hierzu wäre die Tatsache, dass Risp/ Fam21 in diesen Zellen generell keinen Einfluss auf die HIV-Replikation hat, weil es sich bei der Infektion in den Astrozyten um eine persistente Infektion handelt. In den vorliegenden Versuchen handelt es sich um akute Infektionen der Jurkat Zellen und es wäre denkbar, dass die Risp/ Fam21 Proteine ihre antivirale Aktivität erst während einer andauernden Infektion entfalten und noch nicht von Anfang an aktiv sind. Es ist bekannt, dass bei einer HIV-Infektion das Aktinzytoskelett von HIV rekrutiert wird um v.a. Transportwege innerhalb der Zellen von HIV-Proteinen und RNA zu gewährleisten (Kimura et al. 2000, Hofmann et al. 2001, Spear et al. 2012, Spear et al. 2013). Die Aktivierung der Risp/ Fam21 Proteine für Gegenmaßnahmen bei andauernder Infektion mit HIV und der somit verbundenen Zweckentfremdung des Aktinzytoskeletts, könnte somit ein Abwehrmechanismus der Zellen sein um die HIV-Replikation zu unterdrücken. Ein interessanter Versuch dazu wäre zu analysieren, ob die Modulation der Risp/ Fam21 Expression in latent HIV-infizierten T-Zellen (J-Lat) (Jordan et al. 2003) einen Effekt auf die HIV-Replikation ausübt.

4.1.4 Endogene anti-HIV Inhibierung durch Risp/ Fam21 Proteine

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass Risp/ Fam21 Proteine in Astrozyten zu einer Inhibition des HIV Replikationsmechanismus beitragen. Gleichzeitig gibt es aber keinen inhibitorischen Einfluss auf die HIV Replikation in Jurkat T-Zellen bei Überexpression der 16.4.1-Sequenz. Endogene HIV-Inhibitoren sind vermutlich alleine nicht geeignet, um eine systemische Abwehr gegen HIV darzustellen: Einige der bekannten HIV-Restriktionsfaktoren zeigen z.T. eine starke Zellspezifität (Laguette et al. 2011) und am Beispiel von Risp ist zu erkennen, dass es vermutlich bei einer akuten Infektion in T-Zellen keine Effekte zeigt. Für die Inhibierung der HIV-Replikation würde also ein zellulärer Inhibitor alleine nicht ausreichen, sondern müsste immer in Kombination mit anderen Inhibitoren angewendet werden. Aus diesem Grund wurden noch weitere Aspekte der HIV-Inhibition und im speziellen die Inhibierung der HIV-Infektion zu einem frühen Zeitpunkt (vor Eintritt der viralen RNA in die Zelle) analysiert. Durch die Inhibierung der HIV-Infektion

der Zelle könnte, bei sehr früher Behandlung, die Entstehung von latent infizierten Zellen verhindert werden.

4.2 Anti-HIV Aktivität von *Cistus incanus* (Ci) Extrakten

In einer früheren Arbeit in diesem Institut wurde eine Pflanze mit polyphenolischen Inhaltsstoffen, *Pelargonium sidoides* (Ps) als anti-HIV aktiv identifiziert (Helfer et al. 2014), wodurch das Interesse polyphenolreiche Pflanzen als potentielle Quelle neuer HIV-Inhibitoren zu untersuchen, geweckt wurde. Ci wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt, da es sich hierbei um eine sehr polyphenolreiche Pflanze, die zugleich bereits als Medizinprodukt verwendet wird, handelt. Zusätzlich ist diese Pflanze im Mittelmeerraum angesiedelt und zeigt keinerlei Verwandtschaft mit Ps, welches v.a. in Südafrika endemisch ist.

4.2.1 Aktivität verschiedener Ci Präparationen und Verstärkung der anti-HIV Aktivität durch Polyphenolanreicherung

Wie in Abbildung 14A zu sehen ist, zeigen Extrakte die auf unterschiedliche Wege und aus unterschiedlichem Pflanzenmaterial hergestellt wurden, alle ähnliche anti-HIV Aktivität bei Einsetzen vergleichbarer Mengen an Trockenmasse (EC_{50} = Trockenmasse in μg pro ml Zellkulturmedium). Ebenso wurden auch Blätter, Stängel und Wurzeln der frischen Pflanze einzeln untersucht (Daten nicht gezeigt) und auch hier konnte vergleichbare Aktivität für alle Pflanzenteile gezeigt werden. Einhergehend mit diesen Ergebnissen zeigten die Pflanzenextrakte keine bzw. nur geringe Effekte auf die Viabilität der LC5-RIC Zellen, was gegen Zelltoxizität der Extrakte spricht (Abbildung 14B). Die anti-HIV aktiven Bestandteile sind durch Hitzeeinwirkung (Sieden des Pflanzenmaterials in Wasser bei 100°C zur Extraktion der aktiven Bestandteile) als auch Trocknen (getrocknetes Pflanzenmaterial; Eindampfen der Extrakte zur Bestimmung der Trockenmasse), pH-Werten von 1-14 (bei der Polyphenolanreicherung) und Umpufferung in organische Lösungsmittel wie Methanol nicht zu beeinträchtigen, was auf stabile chemische Verbindungen der aktiven Inhaltsstoffe hindeutet. Wie bereits erwähnt, ist Ci eine Pflanze, die sehr reich an polyphenolischen Bestandteilen ist (Petereit et al. 1991, Droebner et al. 2007). Diese Bestandteile können durch wässrige Extraktion in Lösung übergehen und wir haben bereits bei Ps gesehen, dass die polyphenolischen Bestandteile aus dieser Pflanze starke anti-HIV Aktivität besitzen (Helfer et al. 2014). In dem Fall von Ci lässt sich dies auch durch die Tatsache bestätigen, dass bei Anreicherung der Polyphenole mittels PVPP aus den Rohextrakten eine Verstärkung des anti-HIV Effektes zu sehen war (Abbildung 16). Durch die Polyphenolanreicherung lässt sich eine 2-10 fache Verstärkung der EC_{50} -Werte erreichen, je nach Zelltyp und Virus (Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19). Daraus lässt sich also schließen, dass

die Hauptaktivität von Ci gegen HIV durch die enthaltenen Polyphenole vermittelt wird. Dies wurde auch dadurch bestätigt, dass eine Polyphenol-depletierte Fraktion bei den getesteten Konzentrationen keinerlei Aktivität mehr aufweist (Abbildung 16). Einhergehend mit diesen Ergebnissen wurden Polyphenole in den letzten Jahren immer intensiver als HIV-Inhibitoren untersucht (Andrae-Marobela et al. 2013).

4.2.2 Wirkung von Ci Extrakten gegen Viren unterschiedlicher Typen und Gruppen und Validierung der anti-HIV Aktivität in PBMCs

Neben der Untersuchung unterschiedlicher Extrakte auf deren anti-HIV Aktivität, wurden auch unterschiedliche Viren (verschiedene Tropismen (Abbildung 17); Laborstämme sowie Patientenisolates (Abbildung 18)) und unterschiedliche Zellen (LC5-RIC bzw. PBMC (Abbildung 19)) untersucht. Dabei konnten wir zeigen, dass Ci (Rohextrakt wie auch PP Fraktion) gegen Viren mit Tropismus für den Korezeptor CCR5 sowie auch für CXCR4 wirkt, genauso wie auch gegen HIV-1 Viren aus verschiedenen HIV-1 Gruppen. Zum Einen zeigte Ci Wirkung gegen Viren aus der HIV-1 M-Gruppe als auch gegen ein Virus aus der HIV-1 O-Gruppe. Diese Gruppe wird auch Outlier-Gruppe genannt, weil sie eine weiter entfernte phylogenetische Verwandtschaft zur HIV-1 M-Gruppe zeigt, als manche SIV-Stämme. Zum Beispiel zeigt der hier getestete HIV-1O_{MVP5180-91} nur noch ca. 53% Identität in der Env-Aminosäuresequenz im Vergleich zur Konsenssequenz von HIV-1 M Env (Gürtler et al. 1994). Die anti-HIV Aktivität konnte auch mit vergleichbaren EC₅₀-Werten gegen einen HIV-2 Virusstamm (HIV-2_{MVP10668-93}) beobachtet werden. Da HIV-1 und HIV-2 nur noch ca. 40% Identität in den Aminosäuresequenzen im Env-Protein aufweisen (Guyader et al. 1986) und auch der HIV-Fusionsinhibitor T-20 eine stark verminderte Aktivität gegen HIV-2 zeigt (Witvrouw et al. 2004), ist der Fakt, dass Ci eine vergleichbare Wirkung gegen HIV-1 und HIV-2 zeigt, sehr beachtlich. Da wir ja unter anderem auch zeigen konnten, dass Ci scheinbar eine gewisse Spezifität bei der Interaktion mit den Oberflächenstrukturen auf Viruspartikeln aufweist (Abbildung 24), lässt das Zustandekommen der Interaktion trotz z.T. stark variierender Env-Sequenzen darauf schließen, dass Ci vielleicht nicht direkt mit den Proteinanteilen der HIV-Glykoproteine interagiert. Es wäre denkbar, dass Ci an die Glykanketten auf den exponierten Regionen der viralen Glykoproteine bindet. Diese Glykosilierungsmuster sind vor allem auf HIV-1 gp120 sehr ausgeprägt. Gp120 gehört zu den am stärksten glykosilierten, in der Natur vorkommenden Proteinen (Myers et al. 1992) und auch andere virale Glykoproteine, wie z.B. Hemagglutinin von Influenza sind z.T. stark glykosiliert (Zhang et al. 2004). Sollte Ci also mit bestimmten auf Viren vorkommenden Glykosilierungsmustern interagieren, würde das auch erklären, warum Ci nicht nur die diversen HIV-Stämme und –Gruppen inhibiert, sondern auch Aktivität gegen Influenza zeigt. Zum Beispiel wurde von Scanlan et al. beschrieben,

dass der neutralisierende HIV-1 Antikörper 2G12 spezifisch an oligomannose-reiche Glykosylierungsmuster von gp120 bindet und dass solche oligomannose-reichen Zuckerreste nicht-repräsentativ sind für Glykosylierung von Säugetierzellen (Scanlan et al. 2002). Desweiteren wurde auch von Smee et al. beschrieben, dass der Influenza-Inhibitor Cyanovirin-N, ein aus einem Zyanobakterium isoliertes Protein, an solche oligomannose-reichen Glykosylierungsmuster auf dem Hemagglutinin-Oberflächenprotein von Influenza bindet um somit eine Inhibition der Infektion zu vermitteln (Smee et al. 2008). Dieser Inhibitor wurde zuerst als HIV-1 Inhibitor beschrieben und erst später wurde herausgefunden, dass auch andere behüllte Viren durch dieses Protein inhibiert werden können. Aufgrund dieser Tatsachen wäre die denkbare Bindung von Bestandteilen aus den Ci Extrakten an virus-spezifische Glykosylierungsmuster durchaus denkbar.

Die anti-HIV Aktivität von Ci Extrakten gegen HIV-1 M und HIV-1 O wurde auch in PBMCs gezeigt und die antiviralen Effekte konnten somit validiert werden (Abbildung 19). Bei dem Virus HIV-1_{V13-03413B} (Abbildung 18) handelt es sich um ein multiresistentes Virus, gegen welches Ci Extrakte auch Aktivität zeigten. Somit würde also mit Ci die Chance bestehen, dass auch für Patienten die mit multiresistenten HI-Viren infiziert sind, noch ein weiterer Therapieansatz möglich wäre. Die anti-HIV Aktivität von Ci ist also nicht Zielzell-spezifisch und auch nicht spezifisch gegen bestimmte HIV-tropismen bzw. -stämme gerichtet.

4.2.3 Ci Extrakte zeigen anti-HIV Aktivität als Anheftungsinhibitoren

Der „Time-of-Addition“ Assay (Abbildung 20A) zeigte als Wirkzeitpunkt für Ci einen sehr frühen Schritt im Replikationsmechanismus, vermutlich wird ein Schritt, der am Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt ist, inhibiert. Deswegen dürfte bei der Anwesenheit von Ci auf keinen Fall ein Eintritt des viralen Kapsids in die Zelle stattfinden, was durch die Abwesenheit von HIV-RNA in behandelten Zellen bestätigt wurde (Abbildung 20B). Im „Time-of-Addition“ Assay ist zu erkennen, dass sogar noch ein Schritt vor der Fusion von Virus mit Wirtszelle inhibiert wird, weil Ci sogar noch früher wirkt, als der Fusionsinhibitor T-20. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Attachment Assay durchgeführt (Abbildung 21), bei dem, wie der Name schon verrät, untersucht wird, ob das Attachment, also die Anheftung des Virus an die Zelle, inhibiert wird. Die Ergebnisse zeigten sehr deutlich, dass dies der Fall war. Mit Ci bzw. CiPP wurde eine Verringerung der Viruspartikel auf den Zellen von ca. 20 Partikel pro Zelle in der positiv Kontrolle im Vergleich zu ca. 1-3 Partikel pro Zelle in der Anwesenheit von Ci bzw. CiPP beobachtet. Somit stellen Extrakte aus Ci neben Temsavir (BMS-626529; Bristol-Myers Squibb), zwei Beispiele für nicht-antikörperbasierte Anheftungs-Inhibitoren dar. BMS-626529 oder das prodrug BMS-663068 bzw. Fostemsavir, durchliefen erfolgreich klinische

Studien der Phase II und treten nun in Phase III ein (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=BMS-663068&Search=Search>; 07.05.2015). Der bisher vermutete Mechanismus für die Aktivität von BMS-626529 ist die Bindung an gp120, wodurch Konformationsänderungen von gp120 verhindert werden und keine Anheftung des Virus an die Zielzelle mehr geschehen kann (Nowicka-Sans et al. 2012). Das Interesse, einen nicht Antikörper-basierten Anheftungsinhibitor zu finden, ist also auch andernorts sehr groß und diese Wirkklasse scheint auf einem aufstrebenden Ast zu sein. Jedoch decken Extrakte aus Ci noch ein breiteres Wirkspektrum ab als BMS-626529, da dieses beispielsweise nicht gegen den Laborstamm HIV-1_{RF}, sowie auch nicht gegen klinische Isolate der Gruppe HIV-1 O und der HIV-1 M Subgruppe AE wirkt. Gleichermäßen konnte auch keine Aktivität von BMS-626529 gegen HIV-2 sowie gegen Influenza nachgewiesen werden (Nowicka-Sans et al. 2012).

Durch den Präinkubations- (Abbildung 22) und den Mikrobeadversuch (Abbildung 24) konnte gezeigt werden, dass Ci direkt an die Viren bindet, um die Anheftung der Viren an die Zielzelle zu unterbinden, wie das auch schon für die anti-Influenza-Aktivität für Ci mit dem Influenza-Oberflächenprotein Hämagglutinin beschrieben wurde (Droebner et al. 2007). Aus den Präinkubations- und Mikrobeadversuchen konnte auch das Fazit gezogen werden, dass Ci nicht zu einer Lyse der Viruspartikel führt, sondern diese funktionell inaktiviert. Desweiteren scheint die Interaktion mit den Viruspartikeln sehr spezifisch zu sein, da die CD44-Oberflächenproteine für die Virusaufreinigung nicht von den Ci-Bestandteilen verdeckt wurden, sondern für die Bindung an anti-CD44-Microbeads noch zugänglich waren. Zusätzlich konnte auch festgestellt werden, dass diese Interaktion relativ stabil ist, da auch nach drei Waschschritten die mit Ci inkubierte Fraktion eine deutlich verminderte Infektiösität aufwies als die Kontroll-Fraktion ohne Ci (Abbildung 24B).

4.2.4 Bioassay-unterstützte Fraktionierung von Ci Extrakten

Laut Droebner et al. besteht der Cystus052® Sud zu 26% aus Polyphenolen und es wäre von großem Interesse, die Substanzen herauszufiltern, die für die anti-HIV Aktivität verantwortlich sind (Droebner et al. 2007). Deswegen wurde die Firma Bicol mit der Fraktionierung des Cystus052® Rohextraktes beauftragt. Die erste Fraktionierung führte zu einer Auftrennung des Rohextraktes in 96 Fraktionen. Von diesen Rohfraktionen zeigten mehrere Fraktionen zum Teil noch sehr starke anti-HIV Aktivität (Abbildung 26) und gemeinsam mit Bicol haben wir zwei unterschiedlichen Fraktionen ausgewählt für eine weitere Untersuchung. Diese zwei Fraktionen wurden noch weiter aufgetrennt und wieder auf anti-HIV Aktivität im EASY-HIT System getestet (Abbildung 27). Auch hier konnten wieder stark-aktive, hochaufgelöste Fraktionen beobachtet werden. Bei der genaueren Analyse von zwei dieser Feinfraktionen wurde klar, dass sie aus ca. 3-10 einzelnen Substanzen bestehen. In

einem weiteren Schritt wurden also zwei dieser hochaufgelösten Fraktionen (F und P; Abbildung 27) in ihre einzelnen Reinstoffe aufgetrennt. Von diesen Reinsubstanzen wurde die anti-HIV-Aktivität bestimmt (Abbildung 28) und es konnte festgestellt werden, dass auch einige dieser Reinstoffe noch starke anti-HIV-Aktivität besitzen. Dies war vor allem der Fall für die Reinstoffe F-1, F-2, F-3, F-4 und F-8. Diese zeigten wieder anti-HIV Aktivität mit EC_{50} -Werten zwischen 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ wie wir sie bereits in den vorangegangenen Schritten beobachten konnten. Die Substanzen, bei denen bereits eine Strukturaufklärung stattgefunden hat, Vanillinsäure-4-O- β -D-glucopyranosid (P-1) und (-)-Catechin (F-9), zeigten keine oder zumindest weniger starke Aktivität als andere, noch unaufgeklärte Stoffe. Im Vergleich dazu wurden von uns auch käuflich erwerbliche Catechine ((-)- und (+/-)-Catechin von Sigma) getestet und auch hier ist keine anti-HIV-Aktivität im getesteten Bereich mehr zu erkennen. Dies ist jedoch auch nicht verwunderlich, da Catechine (wie auch das Epigallocatechingallat) bereits als anti-HIV Inhibitoren beschrieben wurden (Liu et al. 2005), jedoch nie mit so geringen Wirkkonzentrationen. Epigallocatechingallat hat in unserem Test Aktivität gezeigt, jedoch auch schlechter als die besten Reinstoffe in diesem Test (z.B. F-3: $EC_{50} = 1,32 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ und Epigallocatechingallat $EC_{50} = 5,25 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$). Ein anderer Grund könnte allerdings auch ein Löslichkeitsproblem in PBS und Kulturmedium sein.

Verwunderlich ist auch die Tatsache, dass die Reinstoffe aus der Fraktion P im getesteten Bereich keine anti-HIV-Aktivität mehr zeigen. In dieser Fraktion ist anscheinend ein Trennen der einzelnen Substanzen mit Verlust der Aktivität verbunden. Somit bestünde in diesem Fall die Möglichkeit, dass sich die Einzelsubstanzen gegenseitig in ihrer Aktivität ergänzen können. In der Fraktion F gibt es jedoch mehrere interessante Stoffkandidaten die für sich alleine starke anti-HIV-Aktivität aufweisen.

Was weiterhin auffällt, ist auch, dass (-)-Catechin (Abbildung 28; Stoff Nr. F-9) wenn es aus Ci aufgereinigt wurde, noch anti-HIV Aktivität im getesteten Bereich zeigt, dass die gekauften Catechine aber keine inhibitorische Aktivität zeigen. Dies wäre vielleicht zu erklären durch die Tatsache, dass es sich bei dem aus Ci isolierten, vermeintlichen Catechin vielleicht nicht um Catechin allein handelt und nochmal genauer analysiert werden muss. Da es sich laut Bicolli bei den aktiveren Fraktionen jedoch um andere Stoffe handelt als das bisher identifizierte Catechin, sollten die Bemühungen erstmal in Richtung einer Strukturaufklärung der aktiveren Fraktionen gehen.

4.2.5 Ci als Phytotherapie gegen HIV und Ausblick

Als Fazit lässt sich also feststellen, dass Ci einen interessanten Kandidaten für eine phytotherapeutische Behandlung von HIV darstellt. Ein Vorteil von Ci als Basis für eine Therapie gegen HIV wären zum Beispiel die geringen Kosten, die für die Therapie anfallen würden.

Theoretisch könnten Cistus-Pflanzen von HIV-infizierten Personen direkt selbst angebaut werden und durch Zubereitung eines Suds oder hochkonzentrierten Tees zu einem Extrakt verarbeitet werden. Wir konnten bereits zeigen, dass die Pflanzen beim Anbau keine Standortabhängigkeit haben, da der Extrakt aus einer Pflanze, die bei uns im Labor kultiviert wurde, dieselbe anti-HIV Aktivität ihrer Trockenmasse zeigte, wie Extrakte aus Pflanzen die in dem für Ci endemischen Gebiet geerntet wurden (Abbildung 14).

Natürlich müsste dazu noch detailliert untersucht werden, ob bei oraler Aufnahme der Ci Extrakte genug von den aktiven Substanzen in das Blut eines Patienten aufgenommen werden kann, so dass eine effektive Inhibierung der zirkulierenden Viruspartikel erfolgt. Die Informationen darüber, wieviel man an polyphenolischen Substanzen über den Magen-Darm-Trakt aufnehmen kann, unterscheidet sich stark darin, in welcher Form man diese zu sich nimmt und um welche polyphenolischen Substanzen es sich handelt (Bravo 1998). Zum Beispiel kann man Isoflavone in Form von Sojabohnen zu sich nehmen, wobei hierbei ca. 9-21% je nach Isoflavon absorbiert wurden (Xu et al. 1994). Bei der Aufnahme von Catechinen bei der Einnahme von Tee können ca. 0,2-0,9% der Catechine anschließend im Blut nachgewiesen werden (Lee et al. 1995). Die in dieser Arbeit begonnene Untersuchung, welche der Inhaltsstoffe aus Ci die anti-HIV Aktivität vermitteln und die chemische Analyse dieser Substanzen, ist ein großer Schritt in die Richtung ob eine Aufnahme über das Magen-Darm-System effizient genug ist für die Inhibierung der HIV-Infektion.

Da es sich bei Ci um eine natürliche Mischung von vielen verschiedenen Substanzen handelt, ist im Hinblick auf eine Kombinationstherapie mit dem Ziel Resistenzbildung zu minimieren ein großer Vorteil. Bei der gewöhnlich verabreichten anti-HIV Therapie werden drei verschiedene Medikamente verabreicht und in dem Fall von Ci könnten geschätzt bis zu hundert aktive Substanzen zeitgleich aufgenommen werden. Dadurch kann die Entwicklung eines resistenten Virusstammes minimiert werden. In der Literatur ist bisher keine genaue Definition verbreitet, ab wann ein Virus als resistent gegen einen Inhibitor gilt. Grundsätzlich wird dabei gerne die x-fache Abnahme der Effektivität eines Stoffes betrachtet. Z.B. ist bei Fusionsinhibitoren z.T. schon eine 10-fache Abnahme der Effektivität nach Kultivierung des Virus mit Selektionsdruck über 6 Wochen ein Kriterium für einen resistenten Virus (Rimsky et al. 1998). Für andere Inhibitoren, wie z.B. Integraseinhibitoren kann manchmal auch erst eine 46-116-fache Zunahme des EC_{50} -Wertes als niedrigere Levels der Resistenzbildung und >200-fache Zunahme als höhere Resistenzlevel definiert werden. Für Reverse-Transkriptase-Inhibitoren ist es z.B. beachtlich, dass die Bildung eines resistenten Virus mit >100-fachem Verlust der Aktivität bereits nach 4 Passagen auftreten kann (Tisdale et al. 1993). In ersten, vorläufigen

Experimenten konnten wir keinen Verlust der Ci-Aktivität bei Kultivierung von HIV-1_{LAI} Viren über einen momentanen Zeitraum von 16 Wochen in Anwesenheit von EC₅₀- und EC₉₀-Konzentrationen von Ci erkennen, jedoch müssen diese ersten Ergebnisse noch in mehreren Wiederholungen der Experimente validiert werden.

Ein zusätzlicher Nebeneffekt der Polyphenole birgt noch einen weiteren großen Vorteil. Polyphenolen werden viele positive Eigenschaften zugeschrieben. Sie wirken antibakteriell, antiviral, antiinflammatorisch, antioxidativ und antitumorigen und können somit der Entstehung von opportunistischen Erkrankungen als auch Nebenwirkungen, die mit der HIV-Infektion und deren Therapie einhergehen, vorbeugen. Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, ist durch die antiretrovirale Therapie die Lebenserwartung von HIV-infizierten Individuen stark angestiegen, was zu einem Altern der Population an HIV-positiven Menschen führt. Dadurch ist die Anzahl an Krebserkrankungen stark angestiegen. Dabei sind aber nicht nur AIDS-definierende Krebsarten wie Kaposi-Sarkome und Non-Hodgkins Lymphome (Ledergerber et al. 1999) betroffen, sondern auch nicht-AIDS-definierende Krebsarten wie Brust-, Lungen- oder auch Blutkrebs. Durch die Einnahme von Polyphenolen mit den beschriebenen antiinflammatorischen und antitumorigenen Eigenschaften, könnte dieser Entwicklung zusätzlich entgegengewirkt werden.

Eine weitere denkbare Anwendung von Ci wäre eine Art Nahrungsergänzungsmittel für HIV-infizierte Personen, während oder zwischen der HAART-Behandlung. Durch die komplementäre Einnahme von polyphenolreichen Pflanzenextrakten wie Ci könnte eventuell sogar die Medikamentendosis der HAART herabgesetzt werden, was eine Verringerung der ungewollten Nebenwirkungen zur Folge haben könnte, sowie ein zusätzlicher Schutz des Körpers durch die enthaltenen Polyphenole. Dies ist bisher allerdings nur eine Theorie, die in der Praxis erst noch untersucht werden müsste.

Pflanzenextrakte finden in der Gesellschaft keinen besonders großen Anklang, da Vorurteile sie mit Homöopathie gleichsetzten und da so großen Stoffgemischen, wie es bei Extrakten der Fall ist, oft nachgesagt wird, dass sie ungewollte Nebenwirkungen auslösen könnten (Huxtable 1992, Joshi and Kaul 2001, Niggemann and Grüber 2003). Deswegen ist die Isolierung der aktiven Substanzen sehr interessant, um neue, aktive Einzelsubstanzen für die HIV-Therapie zu finden. Unerlässlich ist an diesem Punkt die Extrakte bzw. Einzelsubstanzen in Mäusen oder direkt in klinischen Studien auf Wirksamkeit zu testen. Auch hier kann mit einer immensen Kostenersparnis gerechnet werden, da zumindest für das bereits auf dem Markt erhältliche Produkt, Cystus052®, keinerlei klinische Phase I Studien mehr nötig sind.

Die weitere Aufklärung der Einzelsubstanzen ist ein anderer wichtiger Fokus für die Zukunft. Denn sollte man auch keine geeignete einzelne Substanz finden, könnte man durch Neukombination aktiver und eventuell synergistisch wirkender Moleküle ein hochspezifisches, wenig zur Resistenzbildung beitragendes Kombinationspräparat herstellen. Weiter gedacht wäre es u.U. sogar möglich, mehrere Präparate mit Kombinationen von jeweils unterschiedlichen aktiven Substanzen zu entwickeln, die zwar alle die Anheftung inhibieren aber eventuell für die eine oder andere Patientengruppe besser geeignet sein könnte wie Kinder, Schwangere, Allergiker, Träger von resistenten Viren und mehr.

Wie in den Ergebnissen zur Identifizierung der anti-HIV-aktiven Inhaltsstoffe aus Ci zu sehen ist, bestehen diese Extrakte aus einer Vielzahl an aktiven Substanzen. Durch die Identifizierung dieser Inhaltsstoffe kann z.B. eine Substanzbibliothek aus antiviralen Naturstoffen erstellt werden. Bisher haben wir zwei polyphenolreiche Pflanzen mit anti-HIV-Aktivität gefunden. In der Zukunft wäre es auch interessant, weitere polyphenolreiche, endemische Pflanzen mit HIV-inhibitorischen Eigenschaften in den Gebieten der Erde mit der höchsten HIV-Prävalenz zu finden.

4.3 Eignung der untersuchten Ansätze als antiretrovirale Therapie

Als Fazit wäre nun festzuhalten, dass der Ansatz zelleigene Mechanismen zur Inhibierung der HIV-Replikation zu verwendet alleine vermutlich nicht ausreicht. Die zellulären Inhibitoren zeigen zum Teil starke Zellspezifität und am Beispiel der bekannten HIV-Restriktionsfaktoren (z.B. Tetherin, SamHD1, APOBEC3G) ist auch festzustellen, dass das Virus Mechanismen entwickelt hat dieser Restriktion entgegenzuwirken. Auch die Risp/ Fam21 Proteine scheinen nach den bisherigen Informationen in T-Zellen mit einer akuten HIV-Infektion keine Wirkung auszuüben. Die Fähigkeit einer HIV-Inhibition dieser Proteine in anderen Zellen sollte dazu allerdings noch weiter untersucht werden. Es lässt sich aber insgesamt feststellen, dass für eine effektive Inhibition der HIV-Infektion die Verwendung von einem einzigen zellulären Inhibitor wahrscheinlich nicht ausreicht, sondern nur eine Kombination von mehreren dieser Faktoren zum Ziel führen wird.

Im Gegensatz dazu können die Extrakte aus Ci sehr effektiv eine aktive Infektion hemmen und deren Schwäche liegt in der fehlenden antiviralen Aktivität gegen bereits infizierte Zellen. Ist eine Infektion bereits etabliert, können die Extrakte von Ci zwar einem Ausbreiten der Infektion entgegenwirken, jedoch stellen sie kein Heilmittel gegen latent infizierte Zellen dar.

Für eine ganzheitliche Bekämpfung einer HIV-Infektion wäre beispielsweise ein kombinierter Ansatz der zwei in dieser Arbeit untersuchten Methoden in Kombination mit der herkömmlichen

Behandlung vielleicht am erfolgversprechendsten. Somit könnte z.B. durch die Modulation der Risp/Fam21 Proteine die Infektion in den latent infizierten Zellen unterdrückt werden und durch die Ci Extrakte könnte die aktive Infektion durch die Verhinderung einer weiteren Virusausbreitung inhibiert werden.

5 Zusammenfassung

Das größte Problem für HIV-infizierte Personen ist die Tatsache, dass die Infektion nicht „geheilt“ werden kann und die Betroffenen ihr Leben lang infiziert bleiben. Deshalb erfordert die HIV Infektion die dauerhafte Anwendung von Therapien, die das Virus an der Replikation hindern und damit die „Viruslast“ im Körper möglichst gering halten. Die optimale Bekämpfung der HIV-Infektion wären Wirkstoffkombinationen die sowohl die Produktion des Virus durch persistent infizierte Reservoirs als auch die Neuinfektion von HIV-Zielzellen unterbinden.

Interessanterweise sind einige zelluläre Faktoren bekannt, die in die HIV-Replikation eingreifen und der HIV-Produktion entgegenwirken können. Ein Beispiel für solche HIV-Restriktionsfaktoren sind die Risp/ Fam21 Proteine, die mit dem HIV Rev Protein interagieren und so vermutlich seine regulatorische Funktion hemmen können. Frühere Untersuchungen an persistent HIV-infizierten Astrozyten belegten einen Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von Risp/ Fam21 und der Hemmung der HIV Produktion in diesen Zellen. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der quantitativen PCR Analyse gezeigt, dass *risp/ fam21* Gene in unterschiedlichen Stärken in menschlichen Zellen exprimiert werden. Zur Modulation der Risp/ Fam21 Expression in diesen als auch anderen für HIV relevanten Zellen wurde ein lentivirales Vektorsystem etabliert. In akut infizierten T-Zellen wurde kein Einfluss der Risp/ Fam21-Modulation auf die HIV-Infektion gefunden, was die Theorie nahelegt, dass Risp/ Fam21 Proteine nur in persistent infizierten Zellen wie den o.g. Astrozyten eine Aktivität zeigen könnten. Diese in der vorliegenden Arbeit entwickelte Hypothese soll als Grundlage für weitere Untersuchungen zu der Rolle von Risp/ Fam21 in spezifischen, persistent HIV-infizierten Zellen dienen.

Um neue Inhibitoren der akuten HIV-Infektion gesunder Zellen zu identifizieren, wurde die medizinische Heilpflanze *Cistus incanus* (Ci) im Hinblick auf ihre anti-HIV Aktivität getestet. Bei dieser Pflanze handelt es sich um eine sehr polyphenolreiche Pflanze und Polyphenole stellen eine interessante Klasse an HIV-Inhibitoren dar. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Präparate aus Ci die Infektion von Zellen hemmen, indem sie spezifisch an die Virusoberfläche binden und die Anheftung der Viren an die Zielzellen verhindern. Präparate aus Ci inhibieren ein sehr breites Spektrum an verschiedenen HIV-Laborstämmen und –Patientenisolaten. Zukünftige Arbeiten zielen auf die Identifizierung von neuen HIV-1 inhibitorischen Einzelsubstanzen aus Ci Extrakten und auf die Weiterentwicklung der Ci Extrakte als kostengünstige anti-HIV Therapieergänzung bzw. –alternativen.

6 Anhang

Anhang 1: Materialien

6.1.1 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

Tabelle 12: Grundzellkulturmedien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Zelltyp	Inhaltsstoffe	Lieferant
Adhärenz wachsende Zellen (U138MG, 85HG66, TH4-7-5, HEK293T, HeLa, LC5-CD4, LC5-RIC, LC5-RIC-R5)	DMEM (mit Glutamax-I, Pyruvat, 4,5g/l Glucose)	Gibco
	10% FKS	Gibco
	1% Anti-Anti	Gibco
Suspensionszellen (Thpl, Jurkat, PBMC)	VLE-RPMI-1640	Biochrom
	10% FKS	Gibco
	1% Anti-Anti	Gibco
Makrophagendifferenzierungs-Medium	VLE-RPMI-1640	Biochrom
	4% humanes Serum vom Typ AB	Sigma-Aldrich
	2mM L-Glutamin	Sigma-Aldrich
	100 U/ml Pen-Strep	Gibco
	1x Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco
	1x Natriumpyruvat	Gibco
	0,4x Vitamine	Gibco
Einfriermedium für adhärenz Zellen	DMEM (mit Glutamax-I, Pyruvat, 4,5g/l Glucose)	Gibco
	20% FKS	Gibco
	1% Anti-Anti	Gibco
Einfriermedium für Suspensionszellen	VLE-RPMI-1640	Biochrom
	20% FKS	Gibco

	1% Anti-Anti	Gibco
--	--------------	-------

6.1.2 Medien für die Kultivierung prokaryotischer Zellen

Tabelle 13: Medien zur Kultivierung von prokaryotischen Zellen

Zelltyp	Inhaltsstoffe	Lieferant
Kultivierungsmedium (LB-Medium)	10g/l Trypton	Sigma-Aldrich
	10g/l NaCl	Sigma-Aldrich
	5g/l Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
	Aqua dest.	
Kultivierungsmedium (LB-Agar)	LB-Medium	s.O.
	15g/l Agar	Sigma-Aldrich
Transformationsmedium	SOC-Medium	Invitrogen

6.1.3 Chemikalien, Puffer und Kits

Tabelle 14: Chemikalien

Name (Zusammensetzung)	Hersteller
2-log DNA ladder	New England Biolabs
30% Acrylamid/ Bis Lösung	BioRad
ACK-Lysepuffer	Life Technologies
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Ameisensäure LC-MS Chromasolv®	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin (Amp; 100µg/ml Stammlösung)	Roth
Antibiotikum-Antimykotikum (100x; Anti-Anti)	Gibco
BSA (Rinderserum Albumin)	Sigma-Aldrich

Buffycoats	Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes
DAPI	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium; Glutamax-I, 4,5 g/l Glucose, Pyruvat)	Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Applichem
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung)	Roth
Ficoll	Biochrom
FKS (Fötales Kälberserum)	Gibco
Xtreme-Gene™ Transfection Reagent	Roche Diagnostics
Geneticin (50 mg/ml Stammlösung)	Gibco
Glycin	Sigma-Aldrich
GoTaq Puffer™ (5x)	Promega
Humanes IL-2 (hIL-2)	Roche
Hygromycin B (50 mg/ml Stammlösung)	Invitrogen
H ₂ O bidest (Milli-Q; Filtriert durch Millipore-Anlage)	Millipore Water System
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH) Chromasolv®	Sigma-Aldrich

Milchpulver	Roth
Mowiol	Roth
MTT-Salz (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid; NaOH 0,5M	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat (100x)	Gibco
Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penezillin-Streptomycin (Pen-Strep)	Gibco
Phytohemagglutinin (PHA)	Biochrom
Polyvinylpyrrolidon (PVPP)	Sigma-Aldrich
Rapid Ligation Puffer (2x)	Promega
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs
Salzsäure; HCl, 2N	Sigma-Aldrich
Saponin	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Sigma-Aldrich
Serum, human, Typ AB	Sigma-Aldrich
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenzsubstrat	Pierce Biotechnology
T4 DNA Ligase (3u/μl)	Promega
TEMED/ N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich

Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trypsin/ EDTA Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA, in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})	Gibco
Tween®20	Sigma-Aldrich
Vitamine	Gibco
VLE-RPMI-1640 (Very-low-endotoxin Roswell Park Memorial Insitute Medium 1640)	Biochrom
Wasser LC-MS Chromasolv®	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 15: Puffer

Name	Zusammensetzung
1% Saponin	1% (w/v) Saponin in PBS
2% PFA	2% (w/v) PFA in PBS
10% APS	10% (w/v) in Milli-Q
10% FKS	10% FKS in PBS
Laufpuffer Gelelektrophorese/ Lämmli-Puffer	0,025 M TRIS, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS
Milchpuffer	5% (w/v) Milchpulver in PBST
MTT Stock Solution	25mg MTT (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid); PBS auf 5 ml; pH 7,4
Phosphat buffered saline (PBS)	140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 9,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{xH}_2\text{O}$, 2mM KH_2PO_4

Phosphat buffered saline-Tween®20 (PBST)	0,1% Tween®20 in PBS
PNL-Lysepuffer	100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Triton-X100, 0,5 % (w/v) DOC
TAE	50x; 2M Tris-Acetat, 100mM Na ₂ -EDTA, 10mM Tris-HCl

Tabelle 16: Kits

Name (Zusammensetzung)	Hersteller
HIV-1 p24 Antigen Capture Assay	Advanced Bioscience Laborytories
KAPA SYBR FAST One-Step LC480 Kit	KAPA Biosystems
NucleoBond PC 500 Kit	Filter Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
RNeasy Mini Kit	Quiagen
µMACS VitalVirus Isolation Kit	Miltenyi Biotec

6.1.4 Verbrauchsmaterialien**Tabelle 17: Verbrauchsmaterialien**

Name	Hersteller/ Lieferant
4titude Frame Star 480 RT-PCR Platte	Surrey
96-well Zellkulturplatten, µ-clear Boden, Wand schwarz	Greiner Bio-One
Amicon® Konzentrationssäulchen 100kDa	Merck Millipore
CL-X-Posure™ Film 18x24 cm	Pierce Biotechnology
Combitips 1-10 ml für Handystep	Eppendorf

Deckgläschen, rund, Ø12mm	Roth
Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2ml	Eppendorf
Falcon® Tissue Culture Dish, 100x20mm	BD Biosciences
Falcon® 15ml, 50ml tubes	BD Biosciences
Fast-Read 102 Zählkammern	Biosigma
Mikrotiterplatten in verschiedenen Formaten (6-, 12-, 24-, 96-well)	Greiner Bio-One
Nunc Cryo Tube™ Vials	Nunc International
Nunc Solo Flask T25, T75 und T175 Zellkulturflaschen	Nunc International
Objektträger; 76 x 26 mm; 1 mm Stärke	Roth
QIAshredder	Quiagen
Pipettenspitzen (10-1000 µl)	Eppendorf
SPE Säulen 1mg, C18 Varian Bond Elute	Agilent Technologies
Spritzen 10ml	BD Biosciences

6.1.5 Geräte

Tabelle 18: Wichtige Geräte

Name	Hersteller/ Lieferant
FACSCanto II™	BD Biosciences
Infinite M200	Tecan Group
Lightcycler® 480 II 96	Roche
Nikon TiE ausgestattet mit dem Perkin Elmer UltraView Vox System	Nikon, Perkin Elmer

Tabelle 19: Sonstige Geräte

Name	Hersteller/ Lieferant
Begasungs Brutschrank	Heraeus
Brutschrank	Memmert
ChemiDoc Geldokumentationsanlage mit der Software Quantity One Vers. 2.4.1. Build 008	RioRad
Concentrator 5301	Eppendorf
Curix 60 Entwicklertaschine	Agfa
Eppendorf Pipettenset „Research“	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Feinwaage NewClassicML	Mettler-Toledo
Gelelektrophorese-Kammer B1A	Owl Separation Systems Inc.
HandyStep Electronic	Brand
HeraSafe Laminar Flow Bank	Heraeus
Hettich Rotana 460 R Zentrifuge	Andreas Hettich Zentrifugen
Laufkammersystem für SDS-PAGE	Biometra
Liquidator ⁹⁶ Benchtop Liquid Handling Device	Steinbrenner Laborsysteme GmbH
Multispeed Vortex	Kisker Biotech
Multitron Schüttelinkubator	Infors
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
PCR Sprint Thermal Cycler	Thermo Scientific

Sigma 3-16 Zentrifuge	Sigma
SmartSpec™ Plus Spektrometer	BioRad
Sorvall RC-5B Refrigerated superspeed centrifuge	Du Pont Instruments
Thermomixer compact	Eppendorf
Transilluminator 312 nm	Bachofer
Ultraschallbad Elmasonic S-10	Elma

6.1.6 Software

Tabelle 20: Software

Name	Hersteller/ Lieferant
Diva	BD Biosciences
Endnote X.7	Thomson Reuters
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Google Scholar	Google
i-control™ Software	Tecan Group
Illustrator CS5	Adobe Systems
Lightcycler® 480 Software (Version 1.5.0.39)	Roche
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp.
nanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Quantity One Vers. 241 Build 008	BioRad
Tecan i control (Tecan Group)	Tecan Group
Velocity® 6.3	Perkin Elmer Inc.

6.1.7 Antikörper

Tabelle 21: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Lieferant	Best. Nr.:	Verdünnungen
Anti-GAPDH; Maus	Calbiochem	CB1001	1:10000 (WB)
Anti-GFP; Hase	Life technologies	A11122	1:1000 (WB)
Risp 8A11 (Ratte); Serviceeinheit monoklonale Antikörper, Helmholtz Zentrum München			1:200 (WB)
Risp 5D3 (Ratte); Serviceeinheit monoklonale Antikörper, Helmholtz Zentrum München			1:200 (WB)
Anti-HIV-1-p24; Maus	Abcam	Ab9071	1:100 (IF)

Tabelle 22: Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Lieferant	Best. Nr.:	Verdünnungen
Alexa Fluor®633, Ziege Anti-maus,	Life technologies	A-21052	1:100 (IF)
Ziege Anti-Hase, PO konjugiert	Jackson Immuno Res.	111-035-003	1:10000 (WB)
Ziege Anti-Maus, PO konjugiert	Jackson Immuno Res.	115-035-068	1:10000 (WB)
Ziege Anti-Ratte, PO-konjugiert	Jackson Immuno Res.	112-035-003	1:10000 (WB)

6.1.8 Verwendete Primer

Tabelle 23: Klonierungsprimer

Name	Orientierung	Sequenz
16.4.1-GFP für pLVTHM	Forward	5'-ATGCTGTTTAAACATGGCTAGCTTTCCTGCTCTAGGC-3' (für PmeI Schnittstelle)

	Reverse	5'-ATGCTACTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3' (für AgeI Schnittstelle)
--	---------	--

Tabelle 24: shRNA-Primer

Name	Orientierung	Sequenz
shFam21 GGTCTTAAGTGGATTACAA	Forward	5'-CGCGTCCCCGGTCTTAAGTGGATTACAATTCAAGA GATTGTAATCCAGTTAAGACCTTTTTGGAAAT-3'
	Reverse	5'-CGATTTCACAAAAAGGTCTTAAGTGGATTACAATCT CTTGAAATGTAATCCAGTTAAGACCGGGGA-3'
Non-silencing shRNA (n.s.) AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Forward	5'-CGCGTCCCCAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCAAGA GAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTGGAAAT-3'
	Reverse	5'-CGATTTCACAAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCT CTTGAAACGTGACACGTTCCGAGAATGGGGA-3'

Schema für das Design der shRNA-Primer: Tronolab

(http://tronolab.epfl.ch/webdav/site/tronolab/shared/protocols/cloning_strategies.html)

Tabelle 25: qRT-PCR-Primer

Name	Orientierung	Sequenz
16.4.1 P1	Forward	5'-CTCTAGGCGAGGCCAGCA-3'
	Reverse	5'-TCATCCTCATCTCCAGGAG-3'
16.4.1 P2	Forward	5'-CCTCTTTACAGATCAGAAAGTCAAG-3'
	Reverse	5'-AGCAAATATATCATCCTCAAAAATATC-3'
16.4.1 P3	forward	5'-GGAAGCAATTAAACCCTCTCA-3'
	reverse	5'-TTTGGTTTTACAGTTAAGTCAGCAA-3'

16.4.1 P4	Forward	5'-CAAAAAGAAAGTGGAAGCCAAG-3'
	Reverse	5'-CAGATCGGCTTTTTGGTTTG-3'
16.4.1 P5	Forward	5'-CCAAACCAAAAAGCCGATCT-3'
	Reverse	5'-CTGGCCTCCAAAGGCATTC-3'
16.4.1 P6	Forward	5'-CCAATAGTCAGCAGGATGTCA-3'
	Reverse	5'-TCTCCTCTCTCTGGTTTCTGA-3'
RNA-Polymerase II (RP II)	Forward	5'-GCACCACGTCCAATGACA-3'
	Reverse	5'-GTGCGGCTGCTTCCATAA-3'
Beta-2-Mikroglobulin (beta-2-micr)	Forward	5'-GCTATCCAGCGTACTCCAAAGAT-3'
	Reverse	5'-GCTTACATGTCTCGATCCCACT-3'
Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GADPH)	Forward	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
	Reverse	5'-GGATCTCGCTCCTGGAAGAT-3'
Phosphoglyceratkinase (PGK1)	Forward	5'-CTGGATGGGCTTGGACTG-3'
	Reverse	5'-TGTCTCCACCACCTATGATGG-3'
TATA-Box bindendes Protein (TATA bbp)	Forward	5'-TATAATCCCAAGCGGTTTGC-3'
	Reverse	5'-CTGTTCTTCACTCTTGGCTCCT-3'
Beta Aktin (beta actin)	Forward	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
	Reverse	5'-ACTCCATGCCCAGGAAGG-3'
18S ribonukleäre RNA (18s rib RNA)	Forward	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
	Reverse	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'
Ribosomenprotein L13a (rib)	Forward	5'-GACCGTGCGAGGTATGCT-3'

prot L13a)	Reverse	5'-CCGCTTTTCTTGTCGTAGG-3'
Beta Tubulin (beta tubulin)	Forward	5'-GTGCCAAGTTCTGGGAGGT-3'
	Reverse	5'-TATTTGCCACCTGTGGCTTC-3'
Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HRPT)	Forward	5'-GTGATGATGAACCAGGTTATG-3'
	Reverse	5'-CTACAGTCATAGGAATGGATC-3'
Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase (G6PD)	Forward	5'-TGCAGATGCTGTGTCTGG-3'
	Reverse	5'-CGTACTGGCCCAGGACC-3'
HIV-RNA	Forward	5'-CCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACC-3'
	Reverse	5'-GTGTGTGGTAGATCCACAGATCAAGG-3'

Tabelle 26: Sequenzierprimer

Name	Orientierung	Sequenz
EF1a (Seuenzierung des Inserts hinter dem EF1α Promoter)	Forward	5'-TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC-3'
H1P (Seuenzierung des Inserts hinter dem H1 Promoter)	Forward	5'-GAATTCGAACGCTGACGTCATCAAC-3'

Anhang 2: Alignment von Fam21A, B,C und D. Für das Alignment wurde für Fam21 A und Fam21C jeweils eine Konsensussequenz aus 6 (Fam21A) respektive 7 (Fam21C) Sequenzen erstellt. Für Fam21 B und D wurden jeweils die einzig vorhandenen cDNA-Sequenzen verwendet. Mit Gelb hinterlegt ist die 16.4.1-Region. Die Rot eingefärbten Regionen in der 16.4.1-Region kennzeichnen die Bindestellen für die qRT-PCR-Primer. In Türkis ist die Zielsequenz für die shRNA gegen FAM21 (shFAM) gekennzeichnet. In Grau ist das Stoppcodon am Ende der 16.4.1-Sequenz gekennzeichnet, was auch gleichzeitig den Beginn der 3'UTR einleitet. Die Sequenzen sind in der Orientierung von 5' zu 3' dargestellt.

```
Fam21A-Konsens atcagggtcacgtgaggccggtcacgccccgggcagcttggtctggggctaggcttccgggg
Fam21B         -----
Fam21C-Konsens -----gtcacgccccgggcagcttggtctggggctaggcttccgggg
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens ctctgcagtcctcggcgtgtgctggcagcttcggagcccaccgagccggggcggctaggat
Fam21B         -----
Fam21C-Konsens ctctgcggtcctcggcctgtgctggcagcctcggagcccaccgagccggggcggctgggat
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens gatgaaccggacgacccccgaccaggagctggcgccagcgtcggagcccgtgtgggagcg
Fam21B         -----
Fam21C-Konsens gatgaaccggacgacccccgaccaggagctggtgccggcgtcggagcccgtgtgggagcg
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens gccgtggtcgggtggaggagatccgcaggagcagccagagctggtcgtctggcgccgacgc
Fam21B         -----
Fam21C-Konsens gccgtggtcgggtggaggagatccgcaggagcagccagagctggtcgtctggcgccgacgc
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens gggcctactacagtttctacaggaattctcacagcaaactatctctaggacccatgaaat
Fam21B         -----
Fam21C-Konsens gggcctactacagtttctacaggaattctcacagcaaactatctctaggacccatgaaat
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens caagaaacaagtggacggactaatccgggaaaccaaagccacagattgtcgctgcataa
Fam21B         -----
Fam21C-Konsens caagaaacaagtggacggactaatccgggaaaccaaagccacagattgtcgctgcataa
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens tgtcttcaatgacttccttatgctctctaatacccagttcattgagaatcgtgtatatga
Fam21B         -----cggtgtatatga
Fam21C-Konsens tgtcttcaatgacttccttatgctctctaatacccagttcatagagaatcgtgtatatga
Fam21D         -----
```

```
Fam21A-Konsens tgaagaagtggaggagccagtactcaaggctgaggcagaaaaaacagagcaggagaagac
Fam21B         tgaagaagtggaggagccagtactcaaggctgaggcagaaaaaacagagcaggagaagac
Fam21C-Konsens tgaagaagtggaggagccagtactcaaggctgaggcagaaaaaacagagcaggagaagac
Fam21D         -----
```

Fam21A-Konsens	acgagagcagaaagaagtagatctcattcctaaagtccaggaggctgtgaactatggctt
Fam21B	acgagagcagaaagaagtagatctcattcctaaagtccaggaggctgtgaactatggctt
Fam21C-Konsens	acgagagcagaaagaagtagatctcattcctaaagtccaggaggctgtgaactatggctt
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	acaagtattggacagtgcctttgagcaacttgatatcaaagcaggaaactcagactccga
Fam21B	acaagtattggacagtgcctttgagcaacttgatatcaaagcaggaaactcagactccga
Fam21C-Konsens	acaagtattggacagtgcctttgagcaacttgatatcaaagcaggaaactcagactccga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	ggaagatgatgctaataaggcggtggaactgaccttgaaccaaaggatctatacattga
Fam21B	ggaagatgatgctaataaggcggtggaactgaccttgaaccaaaggatctatacattga
Fam21C-Konsens	ggaagatgatgctaataaggcggtggaactgaccttgaaccaaaggatctatacattga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tcgtcctttaccatatctcattgggtcaaagctgttcatggaacaagaagatgtaggtct
Fam21B	tcgtcctttaccatatctcattgggtcaaagctgttcatggaacaagaagatgtaggtct
Fam21C-Konsens	tcgtcctttaccatatctcattgggtcaaagctgttcatggaacaagaagatgtaggtct
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tggagagctgtccagtgaagaaggctctgtaggcagtgatcgtggcagtattgtggacac
Fam21B	tggagagctgtccagtgaagaaggctctgtaggcagtgatcgtggcagtattgtggacac
Fam21C-Konsens	tggagagctgtccagtgaagaaggctctgtaggcagtgatcgtggcagtattgtggacac
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tgaggaagagaaagaagaggaggagtcagatgaagattttgcccatcatagtgacaatga
Fam21B	tgaggaagagaaagaagaggaggagtcagatgaagattttgcccatcatagtgacaatga
Fam21C-Konsens	tgaggaagagaaagaagaggaggagtcagatgaagattttgcccatcacagtgacaatga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	acaaaaccggcacaccacacaaatgagtgatgaggaagaggatgatgatggctgtgacct
Fam21B	acaaaaccggcacaccacacaaatgagtgatgaggaagaggatgatgatggctgtgacct
Fam21C-Konsens	acaaaaccggcacaccacacaaatgagtgatgaggaagaggatgatgatggctgtgacct
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tttcgctgactctgagaaggaggaggaagatattgaggacattgaagaaaatactagacc
Fam21B	tttcgctgactctgagaaggaggaggaagatattgaggacattgaagaaaatactagacc
Fam21C-Konsens	ttttgctgactctgagaaggaggaggaagatattgaggacattgaagaaaatactagacc
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	taaaagaagcagacctacatcgtttgagatgagctggctgcccgcacaaaggggatgc
Fam21B	taaaagaagcagacctacatcgtttgagatgagctggctgcccgcacaaaggggatgc
Fam21C-Konsens	taaaagaagcagacctacatcgtttgagatgagctggctgcccgcacaaaggggatgc
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	cgtgggtcgagtggacgaggagccgacaaccttaccctcaggagaagcaaacctcgga
Fam21B	cgtgggtcgagtggacgaggagccgacaaccttaccctcaggagaagcaaacctcgga
Fam21C-Konsens	catgggtcgagtggacgaggagccgacaaccttaccctcaggagaagcaaacctcgga
Fam21D	-----

Fam21A-Konsens	gacactcaaagagaagaaggaaaggagaactccttcagacgatgaagaggataaacttatt
Fam21B	gacactcaaagagaagaaggaaaggagaactccttcagacgatgaagaggataaacttatt
Fam21C-Konsens	gacactcaaagagaagaaggaaaggagaactccttcagacgatgaagaggataaacttatt
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	cgcaccccccaagctgaccgacgaggacttctcgccatttggctctggaggtggcctgtt
Fam21B	cacaccccccaagctgaccgacgaggacttctcgccatttggctctggaggtggcctgtt
Fam21C-Konsens	cgcaccccccaagctgaccgacgaggacttctcgccatttggctctggaggtggcctgtt
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	cagtggggggcaaggggctctttgatgatgaggacgaggagagtgcctcttcacggaagc
Fam21B	cagtggggggcaaggggctatttgatgatgaggacgaggagagtgcctcttcacggaagc
Fam21C-Konsens	cagtggcggaaggggctatttgatgatgaggacgaggagagtgcctcttcacggaagc
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	ccccaggatcggcaagctggagcctctgttaaggaggagtcttcacatccaaacctgg
Fam21B	ccccaggatcggcaagctggagcctctgttaaggaggagtcttcacatccaaacctgg
Fam21C-Konsens	ctcccaggatcggcaagctggagcctctgttaaggaggagtcttcacatccaaacctgg
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	aaagaaaatcccagcaggagctgtttctgtatttttaggagacacggatgtgtttggtgc
Fam21B	aaagaaaatcccagcaggagctgtttctgtatttttaggagacacggatgtgtttggtgc
Fam21C-Konsens	aaagaaaatcccagcaggagctgtttctgtatttttaggagacacggatgtgtttggtgc
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tgctccggttccatcaatgaaggagccacagaagcctgagcagcccactccaaggaaaag
Fam21B	tgctccggttccatcaatgaaggagccacagaagcctgagcagcccactccaaggaaaag
Fam21C-Konsens	tgctccggttccatcactgaaggagccacagaagcctgagcagcccactccaaggaaaag
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	cccctatggtccccctcccactggcctctttgatgatgatgatggtgatgatgatgacga
Fam21B	cccctatggtccccctcccactggcctctttgatgatgatgatggtgatgatgatgacga
Fam21C-Konsens	cccctatggtccccctcccactggcctctttgatgatgatgatggtgatgatgatgacga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	ctttttctcggcaccacacagcaaaccttctaaaaacaggcaaaagtccaatccactgccga
Fam21B	ctttttctcggcaccacacagcaaaccttctaaaaacaggcaaaagtccaatccactgccga
Fam21C-Konsens	ctttttctcggcaccacacagcaaaccttctaaaaacaggcaaaagtccaatccactgccga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tatctttggtgacgaagaaggagatctgttcaaagaaaaagccgtagcatcgccagaagc
Fam21B	tatctttggtgacgaagaaggagatctgttcaaagaaaaagccgtagcatcgccagaagc
Fam21C-Konsens	tatctttggtgacgaagaaggagatctgttcaaagaaaaagccgtagcatcgccagaagc
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	cactgtgagtcagacagatgaaaataaagcaagagcagaaaaaaagggttaccttatcttc
Fam21B	cactgtgagtcagacagatgaaaataaagcaagagcagaaaaaaagggttaccttatcttc
Fam21C-Konsens	cactgtgagtcagacagatgaaaataaagcaagagcagaaaaaaagggttaccttatcttc
Fam21D	-----

Fam21A-Konsens	cagcaaaaatctcaagccctcatcagaaacaaagactcaaaaaggcttatttttcagatga
Fam21B	cagcaaaaatctcaagccctcatcagaaacaaagactcaaaaaggcttatttttcagatga
Fam21C-Konsens	cagcaaaaatctcaagccctcatcagaaacaaagactcaaaaaggcttatttttcagatga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	ggaggactctgaggatttgTTTTcttctcaaagtgcgagtaagttaaaagggtgcgtctct
Fam21B	ggaggactctgaggatttgTTTTcttctcaaagtgcgagtaagttaaaagggtgcgtctct
Fam21C-Konsens	ggaggactctgaggatttgTTTTcttctcaaagtgcgagtaagttaaaagggtgcgtctct
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	gctgcctggcaagctccccacgttggtttccctgTTTgatgatgaagatgaagaggataa
Fam21B	gctgcctggcaagctccccacgtcggtttccctgTTTgatgatgaagatgaagaggataa
Fam21C-Konsens	gctgcctggcaagctccccacgtcggtttccctgTTTgatgatgaagatgaagaggataa
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tctttttgggggtacagctgctaagaagcagacattgtgtctacaagctcagagagaaga
Fam21B	tctttttgggggtacagctgctaagaagcagacattgtgtctacaagctcagagagaaga
Fam21C-Konsens	tctttttgggggtacagctgctaagaagcagacattgtgtctacaagctcagagagaaga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	gaaagcaaaagcctccgagctctccaaaaagaaagcatctgcctgttgTTcagcagtga
Fam21B	gaaagcaaaagcctccgagctctccaaaaagaaagcatctgcctgttgTTcagcagtga
Fam21C-Konsens	gaaagcaaaagcctccgagctctccaaaaagaaagcatctgcctgttgTTcagcagtga
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	tgaggaggaccagtggaaatattcctgcttcacagaccacttagcatctgacagcaggtc
Fam21B	tgaggaggaccagtggaaatattcctgcttcacagaccacttagcatctgacagcaggtc
Fam21C-Konsens	tgaggaggaccagtggaaatattcctgcttcacagaccacttagcatctgacagcaggtc
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	taaaggagaaccagggattctgggaccctccagagccaggaggccaaggctgtgaaaaa
Fam21B	taaaggagaaccagggattctgggaccctccagagccaggaggccaaggctgtgaaaaa
Fam21C-Konsens	taaaggagaaccagggattctgggaccctccagagccaggaggccaaggctgtgaaaaa
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	gaccagtctctttgaggaagacgaagaagatgatctttttgccattgccaaggacagcca
Fam21B	gaccagtctctttgaggaagacgaagaagatgatctttttgccattgccaaggacagcca
Fam21C-Konsens	gaccagtctctttgaggaagacgaagaagatgatctttttgccattgccaaggacagcca
Fam21D	-----
Fam21A-Konsens	aaagaagaccagagagtgtcactcctctttgaagacgatgttgatagcggaggctctct
Fam21B	aaagaagaccagagagtgtcactcctctttgaagacgatgttgatagcggaggctctct
Fam21C-Konsens	aaagaagaccagagagtgtcactcctctttgaagacgatgttgatagcggaggctctct
Fam21D	-----

```

Fam21A-Konsens  gtttggtctctcctcccatctgttcctcctgcaacaaagaaaaaagagactgtctctga
Fam21B           gtttggtctctcctcccatctgttcctcctgcaacaaagaaaaaagagactgtctctga
Fam21C-Konsens  gtttggtctctcctcccatctgttcctcctgcaacaaagaaaaaagagactgtctctga
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  ggcaccaccttttgctgttcagcgatgaagaagagaaggaggcacaacttggagtgaagtc
Fam21B           ggcaccaccttttgctgttcagcgatgaagaagagaaggaggcacaacttggagtgaagtc
Fam21C-Konsens  ggcaccaccttttgctgttcagcgatgaagaagagaaggaggcacaacttggagtgaagtc
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  tgtggataagaaggttgagagtgccaaggagtcattaaaatttgggagaactgatgtggc
Fam21B           tgtggataagaaggttgagagtgccaaggagtcattaaaatttgggagaactgatgtggc
Fam21C-Konsens  tgtggataagaaggttgagagtgccaaggagtcattaaaatttgggagaactgatgtggc
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  tgagtcagaaaaggaaggacttttgactagatctgctcaggaaacagtcaagcattctga
Fam21B           tgagtcagaaaaggaaggacttttgactagatctgctcaggaaacagtcaagcattctga
Fam21C-Konsens  tgagtcagaaaaggaaggacttttgactagatctgctcaggaaacagtcaagcattctga
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  tttattttcttcatcatcccatgggacaaaggaaccaagcctagaacccaaaactgttct
Fam21B           tttattttcttcatcatcccatgggacaaaggaaccaagcctagaacccaaaactgttct
Fam21C-Konsens  tttattttcttcatcatcccatgggacaaaggaaccaagcctagaacccaaaactgttct
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  tagcttgtttgatgaggaagaggataaaaatggaagatcaaacattatccagggtccaca
Fam21B           tagcttgtttgatgaggaagaggataaaaatggaagatcaaacattatccagggtccaca
Fam21C-Konsens  tagcttgtttgatgaggaagaggataaaaatggaagatcaaacattatccagggtccaca
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  gaaagaagtaggaaagggccgcatcctgatgccaccccaagagcacaggtgtcttcca
Fam21B           gaaagaagtaggaaagggccgcatcctgatgccaccccaagagcacaggtgtcttcca
Fam21C-Konsens  gaaagaagtaggaaagggctgcatcctgatgccaccccaagagcacaggtgtcttcca
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  ggatgaagagctgcttttcagccacaagctccaaaaggacaatgaccagatgttgacct
Fam21B           ggatgaagagctgcttttcagccacaagctccaaaaggacaatgaccagatgttgacct
Fam21C-Konsens  ggatgaagagctgcttttcagccacaagctccaaaaggacaatgaccagatgttgacct
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  ttttgctggcaccaaaaaaaaccaagctgttagagccaagtgttgggagcctgtttgggga
Fam21B           ttttgctggcaccaaaaaaaaccaagctgttagagccaagtgttgggagcctgtttgggga
Fam21C-Konsens  ttttgctggcaccaaaaaaaaccaagctgttagagccaagtgttgggagcctgtttgggga
Fam21D           -----

Fam21A-Konsens  tgatgaagatgatgatcttttcagctctgccaagtcccagccttttggtacaagagaaaaa
Fam21B           tgatgaagatgatgatcttttcagctctgccaagtcccagccttttggtacaagagaaaaa
Fam21C-Konsens  tgatgaagatgatgatcttttcagctctgccaagtcccagccttttggtacaagagaaaaa
Fam21D           -----

```

```

Fam21A-Konsens gagagtagtgaaaaaagaccactctgttgactctttcaaaaaccagaaacatcctgaatc
Fam21B          gagagtagtgaaaaaagaccactctgttgactctttcaaaaaccagaaacatcctgaatc
Fam21C-Konsens gagagtagtgaaaaaagaccactctgttaactctttcaaaaaccagaaacatcctgaatc
Fam21D          -----

Fam21A-Konsens cattcaaggtagtaaagaaaaaggcatatggaagccggaacacctca-gcaaatttagc
Fam21B          cattcaaggtagtaaagaaaaaggcatatggaagccagaaacacctcaggcaaatttagc
Fam21C-Konsens cattcaaggtagtaaagaaaaaggcatatggaagccggaacacctcaggcaaatttagc
Fam21D          -----

Fam21A-Konsens gatcaaccagcggccttgctgcccacagcggcttcccagatctctgaagtaaagcctgt
Fam21B          gatcaaccagcggccttgctgcccacagcggcttcccagatctctgaagtaaagcctgt
Fam21C-Konsens gatcaaccagcggccttgctgcccacagcggcttcccagatctctgaagtaaagcctgt
Fam21D          -----

Fam21A-Konsens tttgccagaattggcttttcttcatctgaacacagaaggagccacggctctggaaagtgt
Fam21B          tttgccagaattggcttttcttcatctgaacacagaaggagccacggctctggaaagtgt
Fam21C-Konsens tttgccagaattggcttttcttcatctgaacacagaaggagccacggctctggaaagtgt
Fam21D          -----

Fam21A-Konsens gcctgtccttcccgggagtgaggaggccgggtgtgagttttgatcttccagctcaggcaga
Fam21B          gcctgtccttcccgggagtgaggaggccgggtgtgagttttgatcttccagctcaggcaga
Fam21C-Konsens gcctgtccttcccgggagtgaggaggccgggtgtgagttttgatcttccagctcaggcaga
Fam21D          -----

Fam21A-Konsens caccttacacagtgcacaacaagagccgtgtcaagatgagaggggaagcgtagaccgcagac
Fam21B          caccttacacagtgcacaacaagagccgtgtcaagatgagaggggaagcgtagaccgcagac
Fam21C-Konsens caccttacacagtgcacaacaagagccgtgtcaagatgagaggggaagcgtagaccgcagac
Fam21D          -----agccgtgtcaagatgagaggggaagcgtagaccgcagac
                      *****

Fam21A-Konsens ccgtgcagctaggcggctggctgctcaggagtcacgcgagactgaggacatgagcgtccc
Fam21B          ccgtgcagctaggcggctggctgctcaggagtcacgcgagactgaggacatgagcgtccc
Fam21C-Konsens ccgtgcagctaggcggctggctgctcaggagtcacgcgagactgaggacatgagcgtccc
Fam21D          ccgtgcagctaggcggctggctgctcaggagtcacgcgagactgaggacatgagcgtccc
                      *****

Fam21A-Konsens cagaggacccattgcacagtgggctgatggcgccatttccccaaatggccatcgccaca
Fam21B          cagaggacccattgcacagtgggctgatggcgccatttccccaaatggccatcgccaca
Fam21C-Konsens cagaggacccattgcacagtgggctgatggcgccatttccccaaatggccatcgccaca
Fam21D          cagaggacccattgcacagtgggctgatggcgccatttccccaaatggccatcgccaca
                      *****

Fam21A-Konsens gctcagagcagccagtggagaagacagcactgaggaggccctggcagctgccgctgcacc
Fam21B          gctcagagcagccagtggagaagacagcactgaggaggccctggcagctgccgctgcacc
Fam21C-Konsens gctcagagcagccagtggagaagacagcactgaggaggccctggcagctgccgctgcacc
Fam21D          gctcagagcagccagtggagaagacagcactgaggaggccctggcagctgccgctgcacc
                      *****

Fam21A-Konsens ttgggaaggtgggtcctgtgcctggagtggacagaagcccctttgcaaagtctctgggtca
Fam21B          ttgggaaggtgggtcctgtgcctggagtggacagaagcccctttgcaaagtctctgggtca
Fam21C-Konsens ttgggaaggtgggtcctgtgcctggagtggacacaaagcccctttgcaaagtctctgggtca
Fam21D          ttgggaaggtgggtcctgtgcctggagtggacacaaagcccctttgcaaagtctctgggtca
                      *****

```

```

Fam21A-Konsens  ttccagaggggaggtgacctttttgattctggggacatcttttccacgggcactggatc
Fam21B           ttccagaggggaggtgacctttttgattctggggacatcttttccacgggcactggatc
Fam21C-Konsens  ttccagaggggaggtgacctttttgattctggggacatttttccacgggcactggatc
Fam21D           ttccagaggggaggtgacctttttgattctggggacatttttccacgggcactggatc
*****.*****

Fam21A-Konsens  tcagtctgtggagagaacaaaacccaaggcaaagatagcagagaatcctgccaaccacc
Fam21B           tcagtctgtggagagaacaaaacccaaggcaaagatagcagagaatcctgccaaccacc
Fam21C-Konsens  tcagtccgtggagagaacaaaacccaaggcaaagatagcagagaatcctgccaaccacc
Fam21D           tcagtccgtggagagaacaaaacccaaggcaaagatagcagagaatcctgccaaccacc
*****.*****

Fam21A-Konsens  agtgggtggtaaagcaaagagccccaagtgttctgctctaggtgaggccagcagtgatga
Fam21B           agtgggtggtaaagcaaagagccccaagtgttctgctctaggtgaggccagcagtgatga
Fam21C-Konsens  agtgggtggtaaagcaaagagccccaagtgttctgctctaggtgaggccagcagtgatga
Fam21D           agtgggtggtaaagcaaagagccccaagtgttctgctctaggtgaggccagcagtgatga
*****.*****

Fam21A-Konsens  tgatctcttttcagtctgctaaacaaaaaccagcaaagaaaacaaatcccttttctctcct
Fam21B           tgatctcttttcagtctgctaaacaaaaaccagcaaagaaaacaaatcccttttctctcct
Fam21C-Konsens  tgatctcttttcagtctgctaaacaaaaaccagcaaagaaaacaaatcccttttctctcct
Fam21D           tgatctcttttcagtctgctaaacaaaaaccagcaaagaaaacaaatcccttttctctcct
*****.*****

Fam21A-Konsens  ggaagatgaggatgacctctttacagatcagaaaagtcaagaagaatgagacaaaatccaa
Fam21B           ggaagatgaggatgacctctttacagatcagaaaagtcaagaagaatgagacaaaatccaa
Fam21C-Konsens  ggaagatgaggatgacctctttacagatcagaaaagtcaagaagaatgagacaaaatccag
Fam21D           ggaagatgaggatgacctctttacagatcagaaaagtcaagaagaatgagacaaaatccag
*****.*****

Fam21A-Konsens  tagtcagcaggatgtcatattaacaacacaagatatttttgaggatgatataatttgctac
Fam21B           tagtcagcaggatgtcatattaacaacacaagatatttttgaggatgatataatttgctac
Fam21C-Konsens  tagtcagcaggatgtcatattaacaacacaagatatttttgaggatgatataatttgctac
Fam21D           tagtcagcaggatgtcatattaacaacacaagatatttttgaggatgatataatttgctac
*****.*****

Fam21A-Konsens  ggaagcaattaaaccctctcagaaaaccagagagaaggagaaaacattggaatctaattt
Fam21B           ggaagcaattaaaccctctcagaaaaccagagagaaggagaaaacattggaatctaattt
Fam21C-Konsens  ggaagcaattaaaccctctcagaaaaccagagagaaggagaaaacattggaatctaattt
Fam21D           ggaagcaattaaaccctctcagaaaaccagagagaaggagaaaacattggaatctaattt
*****.*****

Fam21A-Konsens  atttgatgataacattgatatctttgtgacttaactgtaaaaccaaagaaaagtccaa
Fam21B           atttgatgataacattgatatctttgtgacttaactgtaaaaccaaagaaaagtccaa
Fam21C-Konsens  atttgatgataacattgatatctttgtgacttaactgtaaaaccaaagaaaagtccaa
Fam21D           atttgatgataacattgatatctttgtgacttaactgtaaaaccaaagaaaagtccaa
*****.*****

Fam21A-Konsens  aaagaaagtggaagccaagtctatatatttgatgatgatatggatgacatcttctcctctgg
Fam21B           aaagaaagtggaagccaagtctatatatttgatgatgatatggatgacatcttctcctctgg
Fam21C-Konsens  aaagaaagtggaagccaagtctatatatttgatgatgatatggatgacatcttctccactgg
Fam21D           aaagaaagtggaagccaagtctatatatttgatgatgatatggatgacatcttctccactgg
*****.****

```


Fam21A-Konsens tatccaggctaagacaaccaaaccacaaagccgatctgcacaggccgcacctgaaccaag
 Fam21B tatccaggctaagacaaccaaaccacaaagccgatctgcacaggccgcacctgaaccaag
 Fam21C-Konsens tatccaggctaagacaaccaaaccacaaagccgatctgcacaggccgcacctgaaccaag
 Fam21D tatccaggctaagacaaccaaaccacaaagccgatctgcacaggccgcacctgaaccaag

Fam21A-Konsens atttgaacacaaggtgtccaacatctttgatgatcccctgaatgcctttggaggccagta
 Fam21B atttgaacacaaggtgtccaacatctttgatgatcccctgaatgcctttggaggccagta
 Fam21C-Konsens atttgaacacaaggtgtccaacatctttgatgatcccctgaatgcctttggaggccagta
 Fam21D atttgaacacaaggtgtccaacatctttgatgatcccctgaatgcctttggaggccagta

Fam21A-Konsens gagcacacagggtatccacatgttacccctgcagctacattggttgagttagtgatgatgtt
 Fam21B gagcacacagggtatccacatgttacccctgcagctacattggttgagttagtgatgatgtt
 Fam21C-Konsens gagcacacagggtatccacatgttacccctgcagctacattggttgagttagtgatgatatt
 Fam21D gagcacacagggtatccacatgttacccctgcagctacattggttgagttagtgatgatatt

Fam21A-Konsens gtatatgctgatgggtcttaactggattacaaagcaataactagaacagctagctcatc
 Fam21B gtatatgctgatgggtcttaactggattacaaagcaataactagaacagctagctcatc
 Fam21C-Konsens gtatatgctcatgggtcttaactggattacaaagcaataactagaacagctagctcatc
 Fam21D gtatatgctcatgggtcttaactggattacaaagcaataactagaacagctagctcatc

Fam21A-Konsens gttcacccaatgtacttggtatcttctgcactggtttaatcatgcttaataactacaaaa
 Fam21B gttcacccaatgtacttagtatcttctgcactggtttaatcatgcttaataactacaaaa
 Fam21C-Konsens ttttacccaatgtacttagtatcttctgcactggtttaatcatgcttaataactacaaaa
 Fam21D ttttacccaatgtacttagtatcttctgcactggtttaatcatgcttaataactacaaaa
 .**.* *****

Fam21A-Konsens caaaaataaataatttcacagtggttggtttggtttgtttttaaccacagtttgatttag
 Fam21B caaaaataaataatttcacagtggttggtttggtttgtttttaaccacagtttgatttag
 Fam21C-Konsens caaaaataaataatttcacagtggttggtttggtttgtttttaaccacagtttgatttag
 Fam21D caaaaataaataatttcacagtggttggtttggtttgtttttaaccacagtttgatttag

Fam21A-Konsens ttagccttgctggggccataatatgcttcagggtgtgtgtaaaagaagaaatctctttgtgg
 Fam21B ttagccttgctggggccataatatgcttcagggtgtgtgtaaaagaagaaatctctttgtgg
 Fam21C-Konsens ttagccttgctggggccataatatgcttcagggtgtgtgtaaaagaagaaatctctttgtgg
 Fam21D ttagccttgctggggccataatatgcttcagggtgtgtgtaaaagaagaaatctctttgtgg

Fam21A-Konsens ctttcatgggcagggaatcccagagatagcaaatgccacctgaccagaagtctttgttat
 Fam21B ctttcatgggcagggaatcccagagatagcaaatgccacctgaccagaagtctttgttat
 Fam21C-Konsens ctttcatgggcagggaatctcagagatagcaaatgccacctgaccagaagtctttgttat
 Fam21D ctttcatgggcagggaatctcagagatagcaaatgccacctgaccagaagtctttgttat

Fam21A-Konsens atggatgggaaccctaacttagggccttgggcaggggaaagagaaagaaggtgagagatta
 Fam21B atggatgggaaccctaacttagggccttgggcaggggaaagagaaagaaggtgagagatta
 Fam21C-Konsens atggatgggaaccctaacttagggccttgggcaggggaaagagaaagaaggtgagagatta
 Fam21D atggatgggaaccctaacttagggccttgggcaggggaaagagaaagaaggtgagagatta

Fam21A-Konsens tacttcatgagtccttagcaatatgggagcaggttttctactgaattctgagggtgcctctg
 Fam21B tacttcatgagtccttagcaatatgggagcaggttttctactgaattctgagggtgcctctg
 Fam21C-Konsens tacttcatgagtccttagcaatatgggagcaggttttctactgaattctgagggtgcctctg
 Fam21D tacttcatgagtccttagcaatatgggagcaggttttctactgaattctgagggtgcctctg

```
Fam21A-Konsens  catgtcctccaaggcaaagtttggcaaactgtggccccccactgtcatattttgtaa
Fam21B          catgtcctccaaggcaaagtttggcaaactgtggccccccactgtcatattttgtaa
Fam21C-Konsens  catgtcctccaaggcaaagtttggcaaactgtggccccccactgtcatattttgtaa
Fam21D          catgtcctccaaggcaaagtttggcaaactgtggccccccactgtcatattttgtaa
                *****
```

```
Fam21A-Konsens  aaaattttattggaacacaacc---
Fam21B          aaaattttattggaacacaa-----
Fam21C-Konsens  aaaattttattggaacacaatc---
Fam21D          aaaattttattggaacacaatcaca
                *****
```

7 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
18s rib RNA	18S ribonukleäre RNA
Å	Ångström
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom
Amp	Ampicillin
Anti/ Anti	Antimykotikum-Antibiotikum
APC	Allophycocyanin
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
APS	Ammonium persulfate
Arp2/3	Actin-related protein 2/3; Protein zur Aktivierung der Aktinpolymerisation 2/3
ART	Antiretrovirale Therapie
AZT	Azidothymidin
beta actin	Beta Aktin
beta tubulin	Beta Tubulin
beta-2-micr	Beta-2-Mikroglobulin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Zirka
CCR5; R5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	Cluster of Differentiation 4-Rezeptor
CD44	Cluster of Differentiation 44-Rezeptor
cDNA	Complementary DNA; komplementäre DNA
Ci	Cistus incanus
CIMPR	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
cm ²	Quadratzentimeter
cm ²	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CPD	Crossing point; Schwellenwert
CRF	Circulating recombinant forms; Zirkulierende, rekombinante Formen
CRM1	Chromosomal Maintenance 1
CTD	Carboxy-terminale Domäne
CXCR4; X4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	Divalent metal transporter 1

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Triphosphatnukleotide
DsRed1	Discosoma sp. red fluorescent protein 1; Rot-fluoreszierendes Protein
EC ₅₀	Effektive Konzentration 50%
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
env/ Env	HIV-Hüllprotein kodierendes Gen/ HIV-Hüllvorläuferprotein gp160
ER	Entikoplasmatisches Retikulum
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
et al.	und andere
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fam21	Genfamilie mit Sequenzähnlichkeit 21
FCS	Forwardscatter; Vorwärtsstreulicht
FIs	Fusions inhibitoren
FKS	Fötales Kälberserum
fw	Forward; Vorwärts
G6PD	Glukose-6-Phosphaatdehydrogenase
gag/Gag	HIV-Strukturproteine kodierendes Gen/Polyprotein pr55 aus p17, p24 und p7
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
gp120	Glykoprotein 120
gp160	Glykoprotein 160
gp41	Glykoprotein 41
h	Stunden
HAART	Highly active antiretroviral Therapy; Hochwirksame Antiretrovirale Therapie
HCl	Salzsäure
hIL-2	Humanes Interleukin 2
HIV	Humanes Immundesfizienzvirus
HIV-1	Humanes Immundesfizienzvirus vom Typ 1
HIV-2	Humanes Immundesfizienzvirus vom Typ 2
HKG	House-Keeping Gene
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HTLV-III	Humanes T-Zell Leukämie Virus
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria Bertani
LC5-CD4	LC5 Zellen die CD4 exprimieren
LC5-RIC	LC5-CD4 Zellen mit HIV-Indikator; red-inducible cells
LC5-RIC-R5	LC5-RIC Zellen mit CCR5 Korezeptor
LD ₅₀	Letale Dosis 50%
LTR	Long-terminal repeats; Lange, terminale Wiederholungen
MCPIP1	Monozyten chemotaktisches Protein – induzierendes Protein 1
MDM	Monocyte derived macrophages; Makrophagen die aus Monozyten differenziert wurden
MeOH	Methanol

MHC	Major Histokompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA; Boten-RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
MWneg	Mittelwert der Negativkontrollen
Mwpos	Mittelwert der Positivkontrollen
Na ₂ HPO ₄ 2xH ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADC	Non-AIDS defining cancer; Nicht-AIDS definierende Krebsarten
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nef	Negativ Faktor
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NNRTIs	Nicht-nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTIs	Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
NtRTIs	Nukleotidische Reverse Transkriptase Inhibitoren
o.ä.	Oder ähnliche
ORF	Open reading frames; Offene Leseraster
p11	Protease
p15	RNAseH
p17	Matrixprotein
p21 ^{Cip1/Wif1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1; Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen 1
p24	Kapsidprotein
p31	Integrase
p51	Reverse Transkriptase
p6	P6 Protein
p7	Nukleokapsidprotein
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells; Periphere Mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphate buffered saline tween-20; Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	Polymerase chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
Pen-Strep	Penezillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
PHA	Phytohemagglutinin
PIs	Protease Inhibitoren
PNL	Perinukleäre Lyse
pol/ Pol	HIV Polyprotein kodierendes Gen/Polyprotein aus p11, p66/51 und p32
PP	Polyphenole
Ps	Pelargonium sidoides

pTEFb	Positiver Elongationsfaktor b
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Rev	Regulator of expression of virion proteins; Regulator der Expression von viralen Proteinen
rev	Reverse; Rückwärts
rib prot L13a	Ribosomenprotein L13a
Risp	Rev-interacting HIV-suppressor proteins; Rev-interagierende HIV-inhibierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
RPII	RNA polymerase II
RRE	Rev-response element; Bindestelle für Rev
RT	Reverse Transkription
SamHD1	SAM Domain and HD domain 1
SDS	Sodium dodecyl sulfat; Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
shRNA	Short-hairpin RNA
siRNA	Short-interfering RNA
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SorL1	Sortilin-related receptor L1
SPE	Solid Phase Extraktion; Festphasenextraktion
SSC	Sidewardsscatter; Seitwärtsstreulicht
T-20	Enfuvirtide
TAR	Trans-activation response element; Bindestelle für Tat
Tat	Transactivator of transcription; Transaktivator der Transkription
TATA bbp	TATA-Box bindendes Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Units
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS
US\$	United States Dollar
USA	United States of America; Vereinigte Staaten von Amerika
UTR	Untranslated region; nicht-übersetzte Region
V	Volt
vergl.	Vergleiche
Vif	Virionen infektitäts Faktor
VLE-RPMI-1640	Very-low-endotoxin Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
Vpr	Virales Protein R
Vps26	Vacuolar protein sorting 26 protein
Vps29	Vacuolar protein sorting 29 protein
Vps35	Vacuolar protein sorting 35 protein
Vpu	Virales protein U
Vpx	Virales Protein X
VRA	Virus release Assay
VSVG	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein
WASH	Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog

WHO	World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation
xg	G-Kraft; Geschwindigkeit
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Referenzen

Adamson, C. S. and E. O. Freed (2008). "Recent progress in antiretrovirals-lessons from resistance." Drug discovery today **13**(9-10): 424-432.

Adamson, C. S. and E. O. Freed (2010). "Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication." Antiviral research **85**(1): 119-141.

Al-Dakkak, I., S. Patel, E. McCann, A. Gadkari, G. Prajapati and E. M. Maiese (2013). "The impact of specific HIV treatment-related adverse events on adherence to antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis." AIDS care **25**(4): 400-414.

Allers, K., G. Hütter, J. Hofmann, C. Loddenkemper, K. Rieger, E. Thiel and T. Schneider (2011). "Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation." Blood **117**(10): 2791-2799.

Ammaranond, P. and S. Sanguansittianan (2012). "Mechanism of HIV antiretroviral drugs progress toward drug resistance." Fundamental & clinical pharmacology **26**(1): 146-161.

Amoêdo, N. D., A. O. Afonso, S. M. Cunha, R. H. Oliveira, E. S. Machado and M. A. Soares (2011). "Expression of APOBEC3G/3F and G-to-A hypermutation levels in HIV-1-infected children with different profiles of disease progression." PloS one **6**(8): e24118.

Andrae-Marobela, K., F. W. Ghislain, H. Okatch and R. R. Majinda (2013). "Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents." Current drug metabolism **14**(4): 392-413.

Arts, I. C. and P. C. Hollman (2005). "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies." The American journal of clinical nutrition **81**(1): 317S-325S.

Banerjee, U. (2005). "Progress in diagnosis of opportunistic infections in HIV/AIDS." Indian J Med Res **121**(4): 395-406.

Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun and C. Rouzioux (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868.

Batisse, J., S. Guerrero, S. Bernacchi, D. Sleiman, C. Gabus, J.-L. Darlix, R. Marquet, C. Tisné and J.-C. Paillart (2012). "The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication." Virus research **169**(2): 361-376.

Berger, E. A., P. M. Murphy and J. M. Farber (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." Annual review of immunology **17**(1): 657-700.

Berridge, M. V., A. S. Tan, K. D. McCoy and R. Wang (1996). "The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts." Biochemica **4**(1): 15-19.

Blankson, J. N., D. Persaud and R. F. Siliciano (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." Annual review of medicine **53**(1): 557-593.

Blömer, U., I. Gruh, H. Witschel, A. Haverich and U. Martin (2004). "Shuttle of lentiviral vectors via transplanted cells in vivo." Gene therapy **12**(1): 67-74.

Boccaro, F., S. Lang, C. Meuleman, S. Ederhy, M. Mary-Krause, D. Costagliola, J. Capeau and A. Cohen (2013). "HIV and coronary heart disease: time for a better understanding." Journal of the American College of Cardiology **61**(5): 511-523.

Brack-Werner, R., A. Kleinschmidt, A. Ludvigsen, W. Meliart, M. Neumann, R. Herrmann, M. C. Khim, A. Burny, N. Müller-Lantzsch and D. Stavrou (1992). "Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines." Aids **6**(3): 273-286.

Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." Nutrition reviews **56**(11): 317-333.

Briz, V., E. Poveda and V. Soriano (2006). "HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways." Journal of antimicrobial chemotherapy **57**(4): 619.

Brown, T. R. (2015). "I Am the Berlin Patient: A Personal Reflection." AIDS research and human retroviruses **31**(1): 2-3.

Burgoyne, R. W. and D. H. S. Tan (2008). "Prolongation and quality of life for HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy (HAART): a balancing act." Journal of antimicrobial chemotherapy **61**(3): 469.

Butler, M. S. (2004). "The role of natural product chemistry in drug discovery." Journal of Natural Products **67**(12): 2141-2153.

Buzon, M. J., K. Seiss, R. Weiss, A. L. Brass, E. S. Rosenberg, F. Pereyra, G. Y. Xu and M. Lichterfeld (2011). "Inhibition of HIV-1 integration in ex vivo infected CD4 T cells from elite controllers." Journal of virology: JVI. 05327-05311.

Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger and P. S. Kim (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." Cell **89**(2): 263-273.

Chen, H., C. Li, J. Huang, T. Cung, K. Seiss, J. Beamon, M. F. Carrington, L. C. Porter, P. S. Burke and Y. Yang (2011). "CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21." The Journal of clinical investigation **121**(4): 1549-1560.

Chesney, M. (2003). "Adherence to HAART regimens." AIDS patient care and STDs **17**(4): 169-177.

Chun, T.-W., D. Engel, M. M. Berrey, T. Shea, L. Corey and A. S. Fauci (1998). "Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(15): 8869-8873.

Churchill, M. and A. Nath (2013). "Where does HIV hide? A focus on the central nervous system." Current opinion in HIV and AIDS **8**(3): 165-169.

Clavel, F. and A. J. Hance (2004). "HIV drug resistance." New England Journal of Medicine **350**(10): 1023-1035.

Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus and P. Vogt (1986). "Human immunodeficiency viruses." Science **232**(4751): 697.

Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1990). "Identification of HIV-1 vpr product and function." JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **3**(1): 11.

Collins, D. R. and K. L. Collins (2014). "HIV-1 accessory proteins adapt cellular adaptors to facilitate immune evasion." PLoS pathogens **10**(1): e1003851.

Comandini, O., M. Contu and A. Rinaldi (2006). "An overview of Cistus ectomycorrhizal fungi." Mycorrhiza **16**(6): 381-395.

Cos, P., D. V. Berghe, T. D. Bruyne and A. Vlietinck (2003). "Plant substances as antiviral agents: An update (1997-2001)." Current Organic Chemistry **7**(12): 1163-1180.

Cushnie, T. and A. J. Lamb (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." International journal of antimicrobial agents **26**(5): 343-356.

Daelemans, D., R. Pauwels, E. De Clercq and C. Pannecouque (2011). "A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds." Nature protocols **6**(6): 925-933.

Daglia, M. (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." Current opinion in biotechnology **23**(2): 174-181.

Dahabieh, M. S., E. Battivelli and E. Verdin (2015). "Understanding HIV Latency: The Road to an HIV Cure." Annual review of medicine **66**: 407-421.

Dahl, V., L. Josefsson and S. Palmer (2010). "HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication." Antiviral research **85**(1): 286-294.

Damond, F., M. Worobey, P. Campa, I. Farfara, G. Colin, S. Matheron, F. Brun-Vézinet, D. L. Robertson and F. Simon (2004). "Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification." AIDS research and human retroviruses **20**(6): 666-672.

David, B., J.-L. Wolfender and D. A. Dias (2014). "The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends." Phytochemistry Reviews: 1-17.

De Clercq, E. (2007). "Three decades of antiviral drugs." Nature Reviews Drug Discovery **6**(12): 941-941.

De Cock, K. M., G. Adjuorlolo, E. Ekpini, T. Sibailly, J. Kouadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. Vetter, R. Doorly and H. Gayle (1993). "Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic." JAMA: the journal of the American Medical Association **270**(17): 2083.

Delaugerre, C., F. De Oliveira, C. Lascoux-Combe, J.-C. Plantier and F. Simon (2011). "HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon." The Lancet **378**(9806): 1894.

Delelis, O., K. Carayon, A. Saïb, E. Deprez and J. F. Mouscadet (2008). "Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase." Retrovirology **5**(1): 114.

Depatureaux, A., C. Charpentier, M. Leoz, G. Unal, F. Damond, A. Kfutwah, A. Vessière, F. Simon and J.-C. Plantier (2011). "Impact of HIV-1 group O genetic diversity on genotypic resistance interpretation by algorithms designed for HIV-1 group M." JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **56**(2): 139-145.

Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman and S. Wolinsky (2002). "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells." Nature **417**(6884): 95-98.

Droebner, K., C. Ehrhardt, A. Poetter, S. Ludwig and O. Planz (2007). "CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice." Antiviral research **76**(1): 1-10.

Earl, P., B. Moss and R. Doms (1991). "Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." Journal of virology **65**(4): 2047-2055.

Edwards, M., A. Zwolak, D. A. Schafer, D. Sept, R. Dominguez and J. A. Cooper (2014). "Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics." Nature Reviews Molecular Cell Biology **15**(10): 677-689.

Ehrhardt, C., E. R. Hrincius, V. Korte, I. Mazur, K. Droebner, A. Poetter, S. Dreschers, M. Schmolke, O. Planz and S. Ludwig (2007). "A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance." Antiviral research **76**(1): 38-47.

Esté, J. A. and A. Telenti (2007). "HIV entry inhibitors." The Lancet **370**(9581): 81-88.

Fauci, A. S., H. D. Marston and G. K. Folkers (2014). "An HIV cure: feasibility, discovery, and implementation." JAMA **312**(4): 335-336.

- Felber, B. K., M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland and G. N. Pavlakis (1989). "Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(5): 1495-1499.
- Filho, D. J. D. S., M. C. A. Sucupira, M. M. Casiero, E. C. Sabino, R. S. Diaz and L. M. Janini (2006). "Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil." AIDS Research & Human Retroviruses **22**(1): 1-13.
- Foley, B. T. (2000). "An overview of the molecular phylogeny of lentiviruses." HIV sequence compendium **2000**: 35-43.
- Foster, J. L. and J. V. Garcia (2008). "HIV-1 Nef: at the crossroads." Retrovirology **5**(1): 84.
- Frankel, A. D. and J. A. T. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annual review of biochemistry **67**(1): 1-25.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." Somatic cell and molecular genetics **26**(1): 13-33.
- Freed, E. O., G. Englund and M. A. Martin (1995). "Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection." Journal of virology **69**(6): 3949-3954.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl and S. Zolla-Pazner (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters and G. M. Shaw (1999). "Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes." Nature **397**(6718): 436-441.
- Gao, F., L. Yue, D. L. Robertson, S. C. Hill, H. Hui, R. J. Biggar, A. E. Neequaye, T. M. Whelan, D. D. Ho and G. M. Shaw (1994). "Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology." Journal of virology **68**(11): 7433-7447.
- Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw and B. H. Hahn (1992). "Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa."
- Gaynor, R. (1992). "Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression." Aids **6**(4): 347-364.
- Gebo, K. A., J. A. Fleishman, R. Conviser, J. Hellinger, F. J. Hellinger, J. S. Josephs, P. Keiser, P. Gaist and R. D. Moore (2010). "Contemporary costs of HIV health care in the HAART era." AIDS (London, England) **24**(17): 2705.

Gelderblom, H. R., E. H. Hausmann, M. Özel, G. Pauli and M. A. Koch (1987). "Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins." Virology **156**(1): 171-176.

Gertsch, J. (2011). "Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures." Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research **77**(11): 1086.

Gomez, T. S. and D. D. Billadeau (2009). "A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting." Developmental cell **17**(5): 699-711.

Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf and A. Saxon (1981). "Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency." New England Journal of Medicine **305**(24): 1425-1431.

Goujon, C., V. Arfi, T. Pertel, J. Luban, J. Lienard, D. Rigal, J.-L. Darlix and A. Cimorelli (2008). "Characterization of simian immunodeficiency virus SIVSM/human immunodeficiency virus type 2 Vpx function in human myeloid cells." Journal of virology **82**(24): 12335-12345.

Groom, H. C., E. C. Anderson and A. M. Lever (2009). "Rev: beyond nuclear export." Journal of General Virology **90**(6): 1303-1318.

Guenzel, C. A., C. Hérate and S. Benichou (2014). "HIV-1 Vpr—a still “enigmatic multitasker”." Frontiers in microbiology **5**.

Gürtler, L. G., P. H. Hauser, J. Eberle, A. Von Brunn, S. Knapp, L. Zekeng, J. M. Tsague and L. Kaptue (1994). "A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon." Journal of virology **68**(3): 1581-1585.

Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier and M. Alizon (1986). "Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2." Nature **326**(6114): 662-669.

Halliwell, B., J. Rafter and A. Jenner (2005). "Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?" The American journal of clinical nutrition **81**(1): 268S-276S.

Haqqani, A. A. and J. C. Tilton (2013). "Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection." Antiviral research **98**(2): 158-170.

Harbour, M. E., S. Y. Breusegem and M. N. Seaman (2012). "Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended'tail'of Fam21 binding to the retromer protein Vps35." Biochemical Journal **442**(1): 209-220.

Harrich, D., N. McMillan, L. Munoz, A. Apolloni and L. Meredith (2006). "Will diverse Tat interactions lead to novel antiretroviral drug targets?" Current Drug Targets **7**(12): 1595-1606.

Harris, R. S., J. F. Hultquist and D. T. Evans (2012). "The restriction factors of human immunodeficiency virus." Journal of Biological Chemistry **287**(49): 40875-40883.

Heinzinger, N. K., M. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson and M. Emerman (1994). "The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(15): 7311.

Helfer, M., H. Koppensteiner, M. Schneider, S. Rebenburg, S. Forcisi, C. Müller, P. Schmitt-Kopplin, M. Schindler and R. Brack-Werner (2014). "The Root Extract of the Medicinal Plant *Pelargonium sidoides* Is a Potent HIV-1 Attachment Inhibitor." PloS one **9**(1): e87487.

Heng, X., S. Kharytonchyk, E. L. Garcia, K. Lu, S. S. Divakaruni, C. LaCotti, K. Edme, A. Telesnitsky and M. F. Summers (2012). "Identification of a minimal region of the HIV-1 5'-leader required for RNA dimerization, NC binding, and packaging." Journal of molecular biology **417**(3): 224-239.

Hofmann, W., B. Reichart, A. Ewald, E. Müller, I. Schmitt, R. H. Stauber, F. Lottspeich, B. M. Jockusch, U. Scheer and J. Hauber (2001). "Cofactor Requirements for Nuclear Export of Rev Response Element (Rre)–And Constitutive Transport Element (Cte)–Containing Retroviral Rnas An Unexpected Role for Actin." The Journal of cell biology **152**(5): 895-910.

Homann, S., D. Smith, S. Little, D. Richman and J. Guatelli (2011). "Upregulation of BST-2/tetherin by HIV infection in vivo." Journal of virology **85**(20): 10659-10668.

Hu, W.-S. and S. H. Hughes (2012). "HIV-1 reverse transcription." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(10): a006882.

Hütter, G., D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Müßig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kücherer and O. Blau (2009). "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." New England Journal of Medicine **360**(7): 692-698.

Huxtable, R. J. (1992). "The myth of beneficent nature: the risks of herbal preparations." Annals of internal medicine **117**(2): 165-166.

Jacotot, E., K. F. Ferri, C. El Hamel, C. Brenner, S. Druillennec, J. Hoebeke, P. Rustin, D. Métivier, C. Lenoir and M. Geuskens (2001). "Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2." The Journal of experimental medicine **193**(4): 509.

Jia, D., T. S. Gomez, D. D. Billadeau and M. K. Rosen (2012). "Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer." Molecular biology of the cell **23**(12): 2352-2361.

Jones, J., W. Whitford, F. Wagner and O. Kutsch (2007). "Optimization of HIV-1 infectivity assays." Biotechniques **43**(5): 589.

Jordan, A., D. Bisgrove and E. Verdin (2003). "HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro." The EMBO journal **22**(8): 1868-1877.

Joshi, B. S. and P. N. Kaul (2001). Alternative medicine: Herbal drugs and their critical appraisal-Part I. Progress in drug research, Springer: 1-76.

Jowett, J., V. Planelles, B. Poon, N. P. Shah, M. L. Chen and I. Chen (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2+ M phase of the cell cycle." Journal of virology **69**(10): 6304.

Kalus, U., H. Kiesewetter and H. Radtke (2010). "Effect of CYSTUS052® and green tea on subjective symptoms in patients with infection of the upper respiratory tract." Phytotherapy research **24**(1): 96-100.

Kammler, S., M. Otte, I. Hauber, J. Kjems, J. Hauber and H. Schaal (2006). "The strength of the HIV-1 3'splice sites affects Rev function." Retrovirology **3**(1): 89.

Kanki, P., K. U. Travers, R. Marlink, M. Essex, S. MBoup, A. Gueye-Ndiaye, T. Siby, I. Thior, J. Sankale and C. Hsieh (1994). "Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1." The Lancet **343**(8903): 943-946.

Karn, J. and C. M. Stoltzfus (2012). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(2): a006916.

Katlama, C., S. G. Deeks, B. Autran, J. Martinez-Picado, J. van Lunzen, C. Rouzioux, M. Miller, S. Vella, J. E. Schmitz and J. Ahlers (2013). "Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs." The Lancet **381**(9883): 2109-2117.

Kimura, T., I. Hashimoto, A. Yamamoto, M. Nishikawa and J. i. Fujisawa (2000). "Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B." Genes to Cells **5**(4): 289-307.

Klasse, P. J. (2012). "The molecular basis of HIV entry." Cellular microbiology **14**(8): 1183-1192.

Kondo, M., T. Shima, M. Nishizawa, K. Sudo, S. Iwamuro, T. Okabe, Y. Takebe and M. Imai (2005). "Identification of attenuated variants of HIV-1 circulating recombinant form 01_AE that are associated with slow disease progression due to gross genetic alterations in the nef/long terminal repeat sequences." Journal of Infectious Diseases **192**(1): 56-61.

Koppensteiner, H., C. Banning, C. Schneider, H. Hohenberg and M. Schindler (2012). "Macrophage internal HIV-1 is protected from neutralizing antibodies." Journal of virology **86**(5): 2826-2836.

Kramer-Hämmerle, S., F. Ceccherini-Silberstein, C. Bickel, H. Wolff, M. Vincendeau, T. Werner, V. Erfle and R. Brack-Werner (2005). "Identification of a novel Rev-interacting cellular protein." BMC cell biology **6**(1): 20.

Kramer-Hämmerle, S., I. Rothenaigner, H. Wolff, J. E. Bell and R. Brack-Werner (2005). "Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus." Virus research **111**(2): 194-213.

Kremb, S., M. Helfer, W. Heller, D. Hoffmann, H. Wolff, A. Kleinschmidt, S. Cepok, B. Hemmer, J. Durner and R. Brack-Werner (2010). "EASY-HIT: HIV full-replication technology for broad discovery of multiple classes of HIV inhibitors." Antimicrobial agents and chemotherapy **54**(12): 5257.

Kumarasamy, N., S. Vallabhaneni, A. J. Cecelia, T. Yephthomi, P. Balakrishnan, S. Saghayam, T. P. Flanagan, C. C. Carpenter, S. Solomon and K. H. Mayer (2006). "Reasons for modification of generic highly active antiretroviral therapeutic regimens among patients in southern India." JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes **41**(1): 53-58.

Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Ségéral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz and M. Benkirane (2011). "SAMHD1 is the dendritic-and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." Nature **474**(7353): 654-657.

Lassen, K., Y. Han, Y. Zhou, J. Siliciano and R. F. Siliciano (2004). "The multifactorial nature of HIV-1 latency." Trends in molecular medicine **10**(11): 525-531.

Laurent-Crawford, A. G., B. Krust, S. Muller, Y. Rivière, M.-A. Rey-Cuillé, J.-M. Béchet, L. Montagnier and A. G. Hovanessian (1991). "The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis." Virology **185**(2): 829-839.

Lawn, S. D., B. D. Roberts, G. E. Griffin, T. M. Folks and S. T. Butera (2000). "Cellular compartments of human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo: determination by presence of virion-associated host proteins and impact of opportunistic infection." Journal of virology **74**(1): 139-145.

Ledergerber, B., A. Telenti and M. Egger (1999). "Risk of HIV related Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma with potent antiretroviral therapy: prospective cohort study." Bmj **319**(7201): 23-24.

Lee, M.-J., Z.-Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D. A. Balentine and C. S. Yang (1995). "Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects." Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention **4**(4): 393-399.

Leonard, J. T. and K. Roy (2006). "The HIV entry inhibitors revisited." Current medicinal chemistry **13**(8): 911-934.

Li, P., K. Fujimoto, L. Bourguignon, S. Yukl, S. Deeks and J. K. Wong (2014). "Exogenous and endogenous hyaluronic acid reduces HIV infection of CD4+ T cells." Immunology and cell biology.

Lihana, R. W., D. Ssemwanga, A. I. Abimiku and N. Ndembu (2012). "Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review." AIDS Rev **14**(2): 83-100.

Liu, S., H. Lu, Q. Zhao, Y. He, J. Niu, A. K. Debnath, S. Wu and S. Jiang (2005). "Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1723**(1): 270-281.

Liu, S., C. Qiu, R. Miao, J. Zhou, A. Lee, B. Liu, S. N. Lester, W. Fu, L. Zhu and L. Zhang (2013). "MCPIP1 restricts HIV infection and is rapidly degraded in activated CD4+ T cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(47): 19083-19088.

Magalhães, P. J., J. S. Vieira, L. M. Gonçalves, J. G. Pacheco, L. F. Guido and A. A. Barros (2010). "Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry." Journal of chromatography A **1217**(19): 3258-3268.

Malim, M. H. and P. D. Bieniasz (2012). "HIV restriction factors and mechanisms of evasion." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(5): a006940.

Mao, Y., L. Wang, C. Gu, A. Herschhorn, A. Désormeaux, A. Finzi, S.-H. Xiang and J. G. Sodroski (2013). "Molecular architecture of the uncleaved HIV-1 envelope glycoprotein trimer." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(30): 12438-12443.

Mbonye, U. and J. Karn (2014). "Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure." Virology **454**: 328-339.

McCutchan, F. E. (2006). "Global epidemiology of HIV." Journal of medical virology **78**(S1): S7-S12.

McGough, I. J., F. Steinberg, D. Jia, P. A. Barbuti, K. J. McMillan, K. J. Heesom, A. L. Whone, M. A. Caldwell, D. D. Billadeau and M. K. Rosen (2014). "Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35 (D620N) mutation." Current Biology **24**(14): 1670-1676.

Mitsuyasu, R. (2013). "Non-AIDS-defining cancers." Topics in antiviral medicine **22**(3): 660-665.

Mori, T., B. R. O'Keefe, R. C. Sowder, S. Bringans, R. Gardella, S. Berg, P. Cochran, J. A. Turpin, R. W. Buckheit and J. B. McMahon (2005). "Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp." Journal of Biological Chemistry **280**(10): 9345.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods **65**(1): 55-63.

Mueller, N., N. van Bel, B. Berkhout and A. T. Das (2014). "HIV-1 splicing at the major splice donor site is restricted by RNA structure." Virology **468**: 609-620.

Myers, G., K. MacInnes and B. KORBBER (1992). "The emergence of simian/human immunodeficiency viruses." AIDS research and human retroviruses **8**(3): 373-386.

Nájera, R., E. Delgado, L. Pérez-Alvarez and M. M. Thomson (2002). "Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic." Aids **16**: S3-S16.

Nath, A. (2014). "Eradication of human immunodeficiency virus from brain reservoirs." Journal of neurovirology: 1-8.

Neil, S. J., T. Zang and P. D. Bieniasz (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." Nature **451**(7177): 425-430.

Niggemann, B. and C. Grüber (2003). "Side-effects of complementary and alternative medicine." Allergy **58**(8): 707-716.

Nowicka-Sans, B., Y.-F. Gong, B. McAuliffe, I. Dicker, H.-T. Ho, N. Zhou, B. Eggers, P.-F. Lin, N. Ray and M. Wind-Rotolo (2012). "In vitro antiviral characteristics of HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active component of the prodrug BMS-663068." Antimicrobial agents and chemotherapy **56**(7): 3498-3507.

Palmer, S., F. Maldarelli, A. Wiegand, B. Bernstein, G. J. Hanna, S. C. Brun, D. J. Kempf, J. W. Mellors, J. M. Coffin and M. S. King (2008). "Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(10): 3879-3884.

Pan, M.-H., C.-S. Lai and C.-T. Ho (2010). "Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids." Food & function **1**(1): 15-31.

Pan, X., H.-M. Baldauf, O. T. Keppler and O. T. Fackler (2013). "Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes." Cell research **23**(7): 876-885.

Pan, Y.-W., J. M. Scarlett, T. T. Luoh and P. Kurre (2007). "Prolonged adherence of human immunodeficiency virus-derived vector particles to hematopoietic target cells leads to secondary transduction in vitro and in vivo." Journal of virology **81**(2): 639-649.

Pantanowitz, L., H. P. Schlecht and B. J. Dezube (2006). "The growing problem of non-AIDS-defining malignancies in HIV." Current Opinion in Oncology **18**(5): 469-478.

Peden, K., M. Emerman and L. Montagnier (1991). "Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI." Virology **185**(2): 661-672.

Pereira, L. A., K. Bentley, A. Peeters, M. J. Churchill and N. J. Deacon (2000). "A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter." Nucleic acids research **28**(3): 663-668.

Petereit, F., H. Kolodziej and A. Nahrstedt (1991). "Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*." Phytochemistry **30**(3): 981-985.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic acids research **29**(9): e45-e45.

Phillips, R. J., K. J. Helbig, K. H. Van der Hoek, D. Seth and M. R. Beard (2012). "Osteopontin increases hepatocellular carcinoma cell growth in a CD44 dependant manner." World journal of gastroenterology: WJG **18**(26): 3389.

Pierson, T. and R. Doms (2003). HIV-1 entry and its inhibition. Cellular Factors Involved in Early Steps of Retroviral Replication, Springer: 1-27.

Plantier, J.-C., M. Leoz, J. E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemee, F. Damond, D. L. Robertson and F. Simon (2009). "A new human immunodeficiency virus derived from gorillas." Nat Med **15**(8): 871-872.

Pollard, V. W. and M. H. Malim (1998). "The HIV-1 rev protein." Annual Reviews in Microbiology **52**(1): 491-532.

Qian, K., S. L. Morris Natschke and K. H. Lee (2009). "HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy." Medicinal Research Reviews **29**(2): 369-393.

Rimsky, L. T., D. C. Shugars and T. J. Matthews (1998). "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides." Journal of virology **72**(2): 986-993.

Sabino, E. C., E. G. Shpaer, M. G. Morgado, B. Korber, R. S. Diaz, V. Bongertz, S. Cavalcante, B. Galvão-Castro, J. I. Mullins and A. Mayer (1994). "Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil." Journal of virology **68**(10): 6340-6346.

Sáez-Cirión, A., C. Hamimi, A. Bergamaschi, A. David, P. Versmisse, A. Mélard, F. Boufassa, F. Barré-Sinoussi, O. Lambotte and C. Rouzioux (2011). "Restriction of HIV-1 replication in macrophages and CD4+ T cells from HIV controllers." Blood **118**(4): 955-964.

Scanlan, C., R. Pantophlet, M. Wormald, S. E. Ollmann, R. Stanfield, I. Wilson, H. Katinger, R. Dwek, P. Rudd and D. Burton (2002). "The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1--> 2 mannose residues on the outer face of gp120." Journal of virology **76**(14): 7306-7321.

Schneider, M., B. Tigges, M. Meggendorfer, M. Helfer, C. Ziegenhain and R. Brack-Werner (2014). "A new model for postintegration latency in macroglial cells to study HIV-1 reservoirs of the brain." AIDS(in press).

Seaman, M. N., A. Gautreau and D. D. Billadeau (2013). "Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up!" Trends in cell biology **23**(11): 522-528.

Shafer, R. and D. Vuitton (1999). "Highly active antiretroviral therapy (HAART) for the treatment of infection with human immunodeficiency virus type 1." Biomedecine & Pharmacotherapy **53**(2): 73-86.

Sharp, P. M. and B. H. Hahn (2011). "Origins of HIV and the AIDS pandemic." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **1**(1): a006841.

Sharp, P. M., D. L. Robertson and B. H. Hahn (1995). "Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **349**(1327): 41-47.

Shebl, F. M., E. A. Engels and J. J. Goedert (2012). "Opportunistic intestinal infections and risk of colorectal cancer among people with AIDS." AIDS research and human retroviruses **28**(9): 994-999.

Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi and M. H. Malim (2002). "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein." Nature **418**(6898): 646-650.

Sigal, A., J. T. Kim, A. B. Balazs, E. Dekel, A. Mayo, R. Milo and D. Baltimore (2011). "Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy." Nature **477**(7362): 95-98.

Smee, D. F., K. W. Bailey, M.-H. Wong, B. R. O'Keefe, K. R. Gustafson, V. P. Mishin and L. V. Gubareva (2008). "Treatment of influenza A (H1N1) virus infections in mice and ferrets with cyanovirin-N." Antiviral research **80**(3): 266-271.

Souza, S. J., L. A. Luzia, S. S. Santos and P. H. C. Rondó (2013). "Lipid profile of HIV-infected patients in relation to antiretroviral therapy: A review." Revista da Associação Médica Brasileira **59**(2): 186-198.

Spear, M., J. Guo and Y. Wu (2012). "The trinity of the cortical actin in the initiation of HIV-1 infection." Retrovirology **9**(45): 9-45.

Spear, M., J. Guo and Y. Wu (2013). "Novel anti-HIV therapeutics targeting chemokine receptors and actin regulatory pathways." Immunological reviews **256**(1): 300-312.

Stavrou, D., E. Keiditsch, F. Schmidberger, K. Bise, I. Funke, W. Eisenmenger, R. Kurrle, B. Martin and U. Stocker (1987). "Monoclonal antibodies against human astrocytomas and their reactivity pattern." Journal of the neurological sciences **80**(2): 205-220.

Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." Aids **17**: S25-S34.

Strebel, K. (2013). "HIV accessory proteins versus host restriction factors." Current opinion in Virology **3**(6): 692-699.

Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks and M. A. Martin (1987). "The HIV A (sor) gene product is essential for virus infectivity."

Sundquist, W. I. and H.-G. Kräusslich (2012). "HIV-1 assembly, budding, and maturation." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(7): a006924.

Tan, I. L., B. R. Smith, G. von Geldern, F. J. Mateen and J. C. McArthur (2012). "HIV-associated opportunistic infections of the CNS." The Lancet Neurology **11**(7): 605-617.

Tazi, J., N. Bakkour, V. Marchand, L. Ayadi, A. Aboufirassi and C. Branlant (2010). "Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action." FEBS journal **277**(4): 867-876.

Tisdale, M., S. D. Kemp, N. R. Parry and B. A. Larder (1993). "Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(12): 5653-5656.

Torres, R. A. and W. Lewis (2014). "Aging and HIV/AIDS: pathogenetic role of therapeutic side effects." Laboratory Investigation **94**(2): 120-128.

Tran, E. E., M. J. Borgnia, O. Kuybeda, D. M. Schauder, A. Bartesaghi, G. A. Frank, G. Sapiro, J. L. Milne and S. Subramaniam (2012). "Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation." PLoS pathogens **8**(7): e1002797.

Tristem, M., A. Purvis and D. L. Quicke (1998). "Complex Evolutionary History of Primate Lentiviral vpr Genes." Virology **240**(2): 232-237.

Ulenga, N. K., A. D. Sarr, S. Thakore-Meloni, J.-L. Sankalé, G. Eisen and P. J. Kanki (2008). "Relationship between human immunodeficiency type 1 infection and expression of human APOBEC3G and APOBEC3F." Journal of Infectious Diseases **198**(4): 486-492.

Urquiaga, I. and F. Leighton (2000). "Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress." Biological research **33**(2): 55-64.

Van Damme, N., D. Goff, C. Katsura, R. L. Jorgenson, R. Mitchell, M. C. Johnson, E. B. Stephens and J. Guatelli (2008). "The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein." Cell host & microbe **3**(4): 245-252.

Van Lint, C., S. Bouchat and A. Marcello (2013). "HIV-1 transcription and latency: an update." Retrovirology **10**(1): 67.

Vincendeau, M., S. Kramer, K. Hadian, I. Rothenaigner, J. Bell, S. M. Hauck, C. Bickel, D. Nagel, E. Kremmer and T. Werner (2010). "Control of HIV replication in astrocytes by a family of highly conserved host proteins with a common Rev-interacting domain (Risp)." AIDS **24**(16): 2433-2442.

Wachinger, M., A. Kleinschmidt, D. Winder, N. von Pechmann, A. Ludvigsen, M. Neumann, R. Holle, B. Salmons, V. Erfle and R. Brack-Werner (1998). "Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression." Journal of General Virology **79**(4): 731-740.

Watts, J. M., K. K. Dang, R. J. Gorelick, C. W. Leonard, J. W. Bess Jr, R. Swanstrom, C. L. Burch and K. M. Weeks (2009). "Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome." Nature **460**(7256): 711-716.

Whitcomb, J. and S. Hughes (1992). "Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems." Annual review of cell biology **8**(1): 275-306.

Wilen, C. B., J. C. Tilton and R. W. Doms (2012). "HIV: cell binding and entry." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(8): a006866.

Willey, R. L., J. S. Bonifacino, B. J. Potts, M. A. Martin and R. D. Klausner (1988). "Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(24): 9580-9584.

Witvrouw, M., C. Pannecouque, W. M. Switzer, T. M. Folks, E. De Clercq and W. Heneine (2004). "Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis." Antiviral therapy **9**(1): 57-66.

Wiznerowicz, M. and D. Trono (2003). "Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference." Journal of virology **77**(16): 8957-8951.

Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson and J. G. Sodroski (1998). "The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein." Nature **393**(6686): 705-711.

Xu, X., H. J. Wang, P. A. Murphy, L. Cook and S. Hendrich (1994). "Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women." J Nutr **124**(6): 825-832.

Yamaguchi, K., M. Honda, H. Ikigai, Y. Hara and T. Shimamura (2002). "Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)." Antiviral research **53**(1): 19-34.

Yan, H. Y. (2004). "Harvesting drugs from the seas and how Taiwan could contribute to this effort." Changhua J Med **9**(1): 1-6.

Yukl, S. A., E. Boritz, M. Busch, C. Bentsen, T.-W. Chun, D. Douek, E. Eisele, A. Haase, Y.-C. Ho and G. Hütter (2013). "Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient." PLoS pathogens **9**(5): e1003347.

Zhang, M., B. Gaschen, W. Blay, B. Foley, N. Haigwood, C. Kuiken and B. Korber (2004). "Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin." Glycobiology **14**(12): 1229-1246.

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Ruth Brack-Werner bedanken, die mir die Chance gegeben hat diese Doktorarbeit in ihrer Gruppe zu machen und die mir immer mit viel Rat und Unterstützung zur Seite gestanden hat, v.a. um den Überblick aus der ‚Vogelperspektive‘ nicht zu verlieren. Vielen Dank für die wunderschöne Zeit die ich in dieser Arbeitsgruppe verbringen durfte.

Als nächstes würde ich gerne Prof. Dr. Heinrich Leonhardt danken, dass er sich dazu bereit erklärt hat diese Arbeit zu begutachten und dass er trotz seines stressigen Arbeitsalltags stets die Zeit gefunden hat an meinen Thesis Committee Meetings teilzunehmen. Ich möchte auch gerne den anderen Mitgliedern meines Thesis Committees danken für die tollen Diskussionen mit vielen interessanten Ideen in diesen Meetings: Prof. Dr. Bettina Kempkes und Dr. Michael Schindler.

Desweiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Lutz Gürtler für die Bereitstellung der aus Patienten isolierten HIV-Isolate.

Vielen Dank auch an Dr. Michelle Vincendeau für die zahlreichen Gespräche und Hilfe gerade in der Anfangsphase meiner Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Markus Helfer für die tolle Zusammenarbeit, die permanente Unterstützung und für die Hilfe bei jedem Problem dem ich während meiner kompletten Zeit hier so begegnet bin.

Bei allen anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Dr. Martha Schneider, Christine Kammel und Johanna Götz) sowie bei Ingmar Göttesdorfer möchte ich mich auch für die Unterstützung aber vor allem auch für die vielen lustigen Stunden die wir gemeinsam im Büro oder im Labor verbracht haben bedanken. Ohne Euch hätte die Arbeit hier nur halb so viel Spaß gemacht. Vielen Dank auch an die Frauen in der Spülküche: Karen Eberl und Jutta Lang und an unsere gute Fee im Sekretariat: Regina Geiger.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die immer für mich da war und mich in jeder Lebenslage unterstützt hat. Ohne Euch wäre ich heute nicht wo ich bin und deswegen existiert diese Arbeit nur Eurewegen. Vielen Dank!

10 Veröffentlichungen

Rebensburg S., Helfer M., Brack-Werner R. Plant extract for the treatment of an HIV infection as well as products relating thereto. International Publication Number WO 2013/164442 A1 veröffentlicht am 07. November 2013

Helfer, M., H. Koppensteiner, M. Schneider, **S. Rebensburg**, S. Forcisi, C. Müller, P. Schmitt-Kopplin, M. Schindler and R. Brack-Werner (2014). "The Root Extract of the Medicinal Plant *Pelargonium sidoides* Is a Potent HIV-1 Attachment Inhibitor." PloS one 9(1): e87487.

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

(Unterschrift)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- ☐ dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- ☐ dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.
- ☐ dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach und in den Nebenfächern bei der Fakultät für der unterzogen habe.
- ☐ dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den

(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen